N° d'ordre
A.O.6539

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE SCIENTIFIQUE ET MEDICALE
DE GRENOBLE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

par

Marc VINCENDON

APPLICATION DE LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE A HAUTS CHAMPS A L'ETUDE DE LA CHIMIE DES POLYSACCHARIDES

Soutenue le 9 février 1972, devant la Commission d'Examen

MM. Ph. TRAYNARD Président

N. BHACCA
J.P. COHEN-ADDAD Examinateurs
D. GAGNAIRE

N° d'ordre
A.O.6539

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE SCIENTIFIQUE ET MEDICALE
DE GRENOBLE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

par

Marc VINCENDON

APPLICATION DE LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE A HAUTS CHAMPS A L'ETUDE DE LA CHIMIE DES POLYSACCHARIDES

Soutenue le 9 février 1972, devant la Commission d'Examen

MM. Ph. TRAYNARD Président

N. BHACCA
J.P. COHEN-ADDAD Examinateurs
D. GAGNAIRE

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A ma femme

A mon fils

REMERCIEMENTS

Monsieur le Professeur TRAYNARD, Directeur de l'Ecole Française de Papeterie m'a fait l'honneur de présider ce Jury ; qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je remercie Monsieur N.S. BHACCA, Professeur à l'Université d'Etat de Louisiane, d'avoir bien voulu faire partie du Jury.

Je remercie Monsieur J.P. COHEN-ADDAD, Maître de Conférence à l'Université Scientifique et Médicale, d'avoir accepté de juger ce travail.

Cette étude a été effectuée dans le Laboratoire de Chimie Organique Physique du Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble, sous la direction de Monsieur GAGNAIRE, Professeur à l'Université Scientifique et Médicale.

Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour l'aide précieuse qu'il m'a prodiguée ; je lui suis très reconnaissant de l'intérêt constant qu'il m'a témoigné.

Je remercie mes camarades de laboratoire pour l'ambiance qu'ils ont su créer et toutes les personnes, qui de près ou de loin, m'ont aidé dans ce travail.

En particulier Messieurs PATRON et NARDIN pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans la réalisation des spectres à 100 MHz.

Je tiens également à remercier Monsieur J.J. DUNAND de la Société THOMSON-C.S.F. pour la réalisation des spectres à 250 MHz.

TABLE DES MATIERES

Pages

- INTRODUCTION 5

- BIBLIOGRAPHIE 11

- CHAPITRE I - Spectres des acétates de cellulose 15

- BIBLIOGRAPHIE 37

- CHAPITRE II - Détermination par RMN de la position des substituants dans les dérivés cellulosiques 41

- BIBLIOGRAPHIE 59

- CHAPITRE III - Biosynthèse de la cellulose bactérienne : Possibilité d'utilisation de la RMN dans l'étude du mécanisme 61

- BIBLIOGRAPHIE 79

- CHAPITRE IV - Etude de l'extrémité de chaînes de polysaccharides par RMN et de leur réactivité 83

- BIBLIOGRAPHIE 113

INTRODUCTION

L'étude des polymères naturels par résonance magnétique nucléaire (R. M. N.) a permis, bien que le début de cette étude ne date que d'une dizaine d'années, de faire des progrès importants dans la connaissance de ces composés.

L'application de la R. M. N. à l'étude des biopolymères qu'ils soient d'origine animale, comme les protéines ou les acides nucléiques, ou essentiellement d'origine végétale comme les polysaccharides, conduit dans tous les cas au même processus étude des motifs monomères puis des oligomères et enfin du polymère.

La complexité du problème rend cette démarche indispensable.

L'intérêt de la R. M. N., comme dans le cas de toute méthode physique d'investigation, par rapport aux méthodes chimiques, est la possibilité d'observer directement le produit étudié, sans lui faire subir de modification. Ceci est particulièrement important dans le cas des polymères, car toute manipulation peut être suivie d'un fractionnement, soit en masse, soit en nature dans le cas où l'on a un mélange.

Nous allons passer en revue les études faites jusqu'à présent dans les trois grandes familles de biopolymères.

- Les protéines

Les protéines sont des biopolymères d'une importance capitale en biologie. Elles sont constituées par un enchaînement d'acides aminés. On compte une vingtaine d'acides aminés principaux entrant dans la composition des protéines. Les protéines sont donc plus un copolymère qu'un polymère vrai et l'importance du nombre de motifs monomères entrant dans leur constitutions, complique énormément le problème d'élucidation de leur structure.

Dans ce cas l'étude des acides aminés prend une importance très grande. Leur spectre est en général effectué dans D_2O. On a pu ainsi étudier l'échange des protons du groupe amino et du groupe carboxyle [1, 2].

La chaîne carbonée des acides aminés est en général du type $-CH_2-CHR-$, les protons de cette chaîne constituent un système ABC lorsque R est important, (phényl alanine) et un système A^2B lorsque R est petit (acide aspartique) [4].

Lorsqu'on passe à l'enchaînement de deux ou trois acides aminés, comme la glycylglycine, le glycylglycinate les groupes $-CH_2-$ donnent des signaux différents [5]. La liaison peptidique produit un déplacement vers les champs faibles sur les protons en α [6] et la R.M.N. permet d'étudier leur échange dans D_2O [7, 8].

La première protéines étudiée par R.M.N. a été la ribonucléase [9, 10]. L'échange des protons -NH- de cette protéine [11] a permis d'observer deux groupes de protons s'échangeant à vitesses différentes et de mettre en évidence ceux des unités guanidine.

De nombreuses protéines ont depuis été étudiées en R.M.N. [12] comme l'albumine, la β lactoglobuline, la pepsine, le pepsinogène, l'insuline, etc... De la forme des courbes de résonance on peut en déduire des informations sur la flexibilité de la chaîne peptidique, ainsi que la conformation de la chaîne : hélice ou pelote statistique [13, 14, 15]. L'élargissement des raies du spectre de l'hémoglobine et de la myohémoglobine est attribué à la présence d'un atome de fer [16]. La structure et le site actif des enzymes ont également fait l'objet d'études par R.M.N. [17].

- Les acides nucléiques

Ils sont constitués par des enchaînements de nucléotides, ces nucléotides comprennent une base purique ou pyrimidique, associée à un sucre le $\underline{D}$ ribose, ou le $\underline{D}$ désoxyribose estérifié par des groupes phosphates. L'étude R.M.N. des bases puriques [18, 19] ou pyrimidiques [20, 21, 22] a été faite avec, en particulier, l'étude des effets de substituants et les structures tautomères.

En ce qui concerne les nucléosides, la R.M.N. a permis d'étudier les complexes formés entre nucléosides et bases puriques ou pyrimidiques en solution [23, 24].

On a pu mettre en évidence le ligand entre le Cu (II) et l'atome d'azote des bases dans les nucléotides, en précisant même la position ; en effet, le signal du proton voisin de l'azote lié, s'élargit considérablement [25].

On a également utilisé pour étudier ce problème, le spectre du phosphore dans le cas de désoxyribonucléotides de l'adénine, de la thymine, dans lesquels les signaux du phosphore s'élargissent considérablement, montrant ainsi que le cuivre se lie au groupe phosphate [26].

En ce qui concerne les polynucléotides, la R.M.N. rend un grand service dans l'étude de l'orientation de ces polymères. La variation du déplacement chimique des protons de la polyadénosine en solution dans D_2O, lorsque la température augmente de 25 à 60°C, indique le passage d'un ordre partiel à température ambiante, à une distribution statistique [27]. Il y a en même temps, diminution de la largeur de raie. L'acide déoxyribonucléique (ADN) extrait du thymus de veau, montre le même phénomène indiquant qu'il existe des zones partiellement organisées [28].

Le spectre de l'ARN, provenant de levures, en solution dans un tampon phosphorique dont le pH varie de 4 à 11, a permis d'estimer la fraction se trouvant sous forme d'hélice. Cette fraction est de 50 °/₀ à pH = 7 et de 30 °/₀ à pH = 11 [29].

- Les polysaccharides

Lorsque nous nous sommes intéressés au problème de l'étude des polysaccharides au moyen de la R.M.N., peu de travaux avaient été consacrés à ce problème. Seuls les mono et disaccharides avaient déjà été étudiés.

La première étude R.M.N. des dérivés des oses est due à LEMIEUX [30]. Depuis un grand nombre de travaux ont permis un véritable bond en avant dans la chimie des mono et des polysaccharides, la R.M.N. étant la seule technique permettant l'analyse conformationnelle de ces corps.

L'étude des sucres simples, motifs monomères de polysaccharides, comme le D-arabinose, le D-ribose, le D-mannose et le D-galactose en solution dans l'eau lourde a permis d'obtenir des informations sur l'équilibre tautomère de ces corps en solution, ainsi que sur leur conformation [31]. On peut tirer plusieurs règles des études faites [32, 33].

- Dans tous les sucres le protons anomère, porté par le carbone 1 est le plus déplacé vers les champs faibles.

- Le déplacement de ce protons est différent s'il est sous forme axiale (H_1a) ou équatoriale (H_1e). Le proton H_1e est plus déplacé sur le proton H_1a, ce qui indique que l'on peut différencier les formes α et β des sucres en solution, par R.M.N.

- La constante de couplage $J_{H_1H_2}$ est différente pour la forme α et la forme β. En général elle est de 3 à 4 Hz pour la forme α et de 7 à 9 Hz pour la forme β, dans la série du glucose. Ceci est dû à la variation de l'angle dièdre défini par les plans $H_1C_1 - C_2H_2$, de 60 à 180°.

- Le déplacement chimique de tous les protons du cycle dépend de la position des groupes OH voisin. Un groupe OH voisin axial déplace plus qu'un groupe équatorial.

On peut par intégration des signaux de protons H_{1e} et H_{1a} donner le pourcentage de forme anomère en solution.

D'autre part, les sucres sous forme pyrannique chaise donnent par inversion un isomère de conformation. Dans certains cas comme le β D-glucose où tous les OH sont équatoriaux par inversion on obtient tous les OH axiaux, donc un isomère tout à fait instable. Par contre il existe des cas dans lesquels la différence d'énergie entre les deux formes n'est pas aussi grande, il existe alors un équilibre d'inversion que l'on note $1C \rightleftarrows C1$ pour les sucres. (Selon la nomenclature de Reeves).

Cet équilibre peut être étudié en R.M.N., car dans les deux formes les protons auront des constantes de couplage et des déplacements chimiques différents. Si nous reprenons le cas du β - D-glucose, les protons H_1 H_2 seront diaxiaux avec J = 8 Hz dans une forme et diéquatoriaux avec J = 4 Hz dans l'autre forme.

Dans l'eau tous les protons des groupes hydroxyles résonnent à la même fréquence, du fait de l'échange chimique.

En utilisant un solvant tel que le diméthylsulfoxyde, on peut différencier tous les OH, des monosaccharides. En général, les groupes hydroxyles ne sont couplés qu'à un proton à

travers le fragment H-O-C-H et sortent sous forme de doublets [34, 35, 36]. On trouve que le OH anomère en position 1 (O_1H) est le plus déplacé vers les champs faibles. Par des expériences de deutériation sélective on a pu différencier la forme furanose et la forme pyranose, en utilisant le couplage du proton de l'hydroxyle. En effet, dans le cas de la forme furanose, le carbone 4 ne porte pas d'hydroxyle, alors que dans le cas de la forme pyranose c'est le carbone 5. Par deutériation de la position 5 du cycle du glucose, on ne change pas la forme de raie de l'hydroxyle, qui est donc couplé au proton 4 et par conséquent, le glucose est sous forme pyranose.

Une application importante de la R.M.N. dans la chimie des monosaccharides est l'étude de la substitution des différentes positions du cycle. Dans l'étude préliminaire de LEMIEUX [30] sur les acétates de glucose, celui-ci avait essayé de tirer des conclusions en ce qui concerne le déplacement chimique des méthyles des groupes acétates, suivant leur position axiale ou équatoriale. Un groupe acétate en position axiale étant plus déplacé vers les champs faibles que le même groupe en position équatoriale, ceci a pu être confirmé par d'autres études [37, 38, 39]. Mais l'application la plus importante a été l'identification des déplacements chimiques de tous les groupes acétates dans le 2-acétamido 2-désoxy α et β -D-glucopyranose [40, 41], monomère de la chitine, dans le tétraacétyl méthyl α D-glucopyranoside [42] et dans le pentaacétyl β D-glucopyranose [43]. L'attribution des méthyles dans l'anomère α ayant été faite par référence à l'anomère β [44]. L'identification se fait par référence au produit entièrement acétylé. Les auteurs utilisent la technique qui consiste à supprimer un des groupes acétates par deutériation spécifique d'une des position à l'acide acétique - d_3, puis lorsque la position est acétylée, à peracétyler par l'acide acétique, on obtient donc un corps identique au peracétate obtenu directement par acétylation classique, avec cependant pour la R.M.N., la disparition du pic acétate correspondant à la position deutériée. Par deutériation spécifique de toutes les positions on a pu ainsi identifier les différents pics. Suivant la nature du solvant, le déplacement chimique des pics méthyles varie, mais dans le chloroforme et l'acétone, c'est le groupe méthyle en position 1 qui est le plus déplacé et le N-acétyl le moins déplacé.

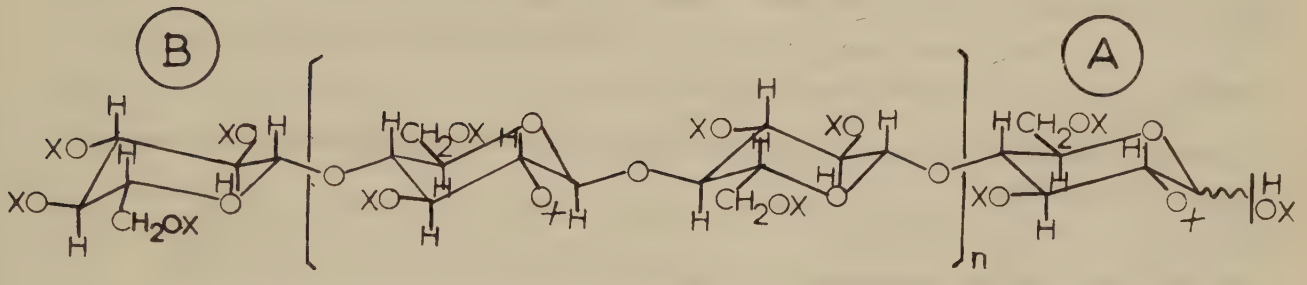
Le même travail a été effectué sur les anomères α et β du tétra-0-méthyl 2-3-4-6 méthyl -D- glucopyranoside [45]. Dans le cas de l'anomère α, le méthyle en position 1 est le moins déplacé dans le mélange chloroforme-benzène (6/1) choisi, de telle manière que tous les pics soient séparés. Ce qui est intéressant dans l'optique d'une extension à l'étude de polysaccharides dérivés du glucose par liaison 1-4, c'est que les groupes méthyles en 2 et 3 sont plus déplacés que le méthyle en position 6.

En ce qui concerne les oligosaccharides, les seuls produits étudiés ont été le maltose et le cellobiose, ainsi que les α, β, γ dextrines du type SCHARDINGER [40, 43]. Les spectres effectués dans D_2O ne permettent pas d'observer les groupes OH, cependant l'intégration des protons anomères par rapport aux autres protons a permis à ces auteurs de confirmer que les dextrines étaient bien constituées de six, sept et huit unités glucose.

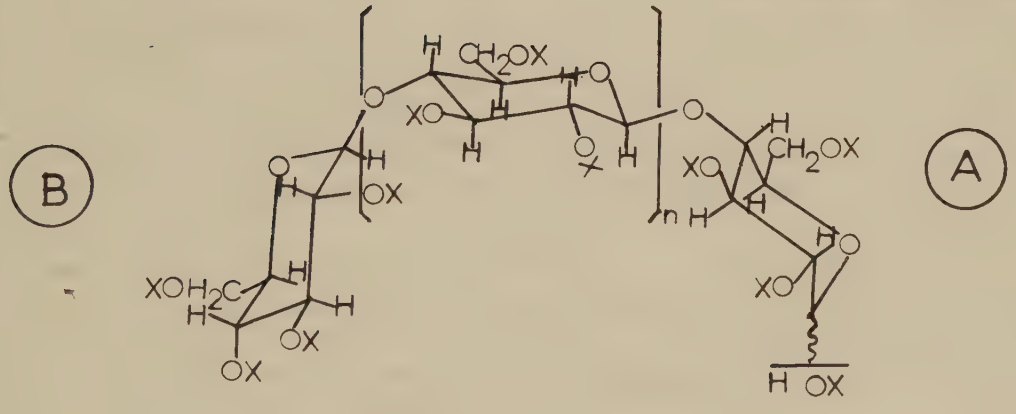
Les spectres effectués dans le diméthylsulfoxyde permettent d'observer la résonance spécifique de chaque groupe OH ce qui complique le spectre. Dans la série des oligosaccharides de l'amylose, comme dans le cas du glucose, le groupe O_1-H est le plus déplacé. Il existe un groupe de deux OH, nettement plus déplacé que les autres, ces deux OH ont été

attribués aux groupes $-O_2H$ et $O_3'H-$ [36b] qui sont liés par liaison hydrogène dans cette série, car ils se font face. Ce résultats a pu être étendu à l'amylose et aux α et β dextrines [48]. Cette liaison entre deux unités glucose successives est un facteur de stabilité pour la conformation en hélice de l'amylose [36b, 49, 50]. La cellulose, par manque de solvants susceptibles d'être utilisés en R.M.N. n'a pas été étudiée.

En ce qui concerne les dérivés de polyglucose 1-4, du type amylose, ou cellulose, le R.M.N. peut être d'une grande utilité dans leur étude. En effet, si l'on regarde l'enchaînement des unités monomères dans ces deux polymères (figure 1), un certain nombre de problèmes se posent qui peuvent être résolus par R.M.N.



CELLULOSE (X=H)



AMYLOSE (X=H)

Figure 1

- Dans le cas de dérivés de ces polymères obtenus par réaction sur la fonction alcool (X = H) du polymère naturel, on peut passer à des éthers si X = R, R étant en général un groupe méthyle ou à des esters comme dans le cas où R = Ac. On obtient ainsi les dérivés les plus courants de la cellulose, à savoir les méthyles celluloses et les acétates de cellulose. Les réactions ne sont en général pas complètes, et la distribution des substituants sur les trois positions réactives du cycle glucopyranose, se fait de manière statistique.

- Un premier point est de connaître le degré de substitution moyen ($\overline{D\,S}$) sur le polymère. Cette détermination est en principe possible en R.M.N. puisque l'on change un groupe OH en OR et que le nombre de protons change.

- Un deuxième point est de pouvoir identifier le degré de substitution de chacune des trois positions 2, 3, 6, chose impossible par dosage chimique.

Ceci est encore possible par R.M.N., car il n'y a aucune raison que les protons des substituants des trois positions aient le même déplacement chimique.

Nous voyons également que la représentation de la cellulose et de l'amylose implique trois espèces d'unités monomères différentes :

- l'unité A d'extrémité anomère libre de la chaîne, qui possède les propriétés de la position anomère des sucres.
- l'unité B d'extrémité terminale.
- les 2n ou les n unités centrales pour la cellulose et l'amylose.

Il est également possible que la R.M.N. puisse distinguer ces trois types de motifs anhydroglucose.

C'est à partir de ces considérations et de l'amélioration technique de cette méthode, telle que l'introduction de la R.M.N. à haut champ et de la technique d'accumulation des spectres (CAT) que nous avons entrepris l'étude des polysaccharides par R.M.N.

BIBLIOGRAPHIE

[1] M. TAKEDA, O. JARDETSKY
J. Chem. Phys., 1957, 26, 1346.

[2] R.A. OGG
Discuss. Farad. Soc., 1954, 17, 215.

[3] H.J. BERNSTEIN, J.A. POPLE, W.G. SCHNEIDER
Can. J. Chem., 1957, 35, 65.

[4] S. FUJIWARA, Y. ARATA
Bull. Chem. Soc. Japan, 1963, 36, 578.

[5] R.C. FERGUSON, W.D. PHILIPS
Science, 1967, 257.

[6] F.A. BOVEY, G.V.D. TIERS
J. Amer. Chem. Soc., 1959, 81, 2870.

[7] M. FRIDKIN, M. WILCHER, M. SHEINBIATT
Biochem. Biophys. Res. Comun., 1970, 38(3), 458.

[8] M. SHEINBLATT
J. Amer. Chem. Soc., 1970, 92(8), 2505.

[9] M. SAUNDERS, A. WISHNIA, J.C. KIRKWOOD
J. Amer. Chem. Soc., 1957, 79, 3289.

[10] O. JARDETZKY, C.D. JARDETZKY
J. Amer. Chem. Soc., 1957, 79, 5322.

[11] A. WISHNIA, N. SAUNDERS
J. Amer. Chem. Soc., 1962, 84, 4235.

[12] A. KOWALSKY
J. Biol. Chem., 1962, 237, 1807.

[13] J.H. BRADBURY, M.D. FENN
Aust. J. Chem., 1969, 22(2), 357.

[14] J.C. HAYLOCK, H.N. RYDON
Coll. Int. Cent. Nat. Recherche Sci., 1968, 75, 19.

[15] J.H. BRADBURY, N.I.R. KING
Aust. J. Chem., 1969, 22(5), 1083.

[16] C.C. Mc DONALD, W.D. PHILIPS
J. Amer. Chem. Soc., 1967, 89, 6333.

[17] D.H. MEADOWS, J.I. MARLEY, J.S. COHEN, O. JARDETZKY
Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1967, 58, 1307.

[18] F.J. BULLOCK, O. JARDETZKY
J. Org. Chem., 1964, 29, 1988.

[19] W.C. COBURN, M.C. THORPE, J.A. MONTGOMERY, K. HEWSON
J. Org. Chem., 1965, 30, 1110.

[20] O. JARDETZKY
Biopolymers, 1964, 1, 501.

[21] E.D. BECKER, H.T. MILES, R.B. BRADLEY
J. Amer. Chem. Soc., 1965, 87, 5575.

[22] S. GRONOWITZ, B. NORMAN, G. GESTBLOM, B. MATHIASON, R.A. HOFFMAN
Arkiv. Kemi., 1964, 22, 65.

[23] M.P. SCWEITZER, S.I. CHAN, P.O.P. TSO
J. Amer. Chem. Soc., 1965, 87, 5241.

[24] A.D. BROOM, M.P. SCHWEITZER, P.O.P. TSO
J. Amer. Chem. Soc., 1967, 89, 3612.

[25] G.L. EICHHORN, P. CLARK, E.D. BECKER
Biochemistry, 1966, 5, 245.

[26] H. BRINTZINGER
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 77, 343.

[27] C.C. Mc DONALD, W.D. PHILIPS, J. PENSWICK
Biopolymers, 1965, 3, 609.

[28] C.C. Mc DONALD, W.D. PHILIPS, S. PENMAN
Science, 1964, 144, 1234.

[29] Y. INOUE, K. NAKANISHI
Bioch. Biophys. Acta, 1966, 120, 311.

[30] R.V. LEMIEUX, R.K. KULLNIG, H.J. BERNSTEIN, W.G. SCHNEIDER
J. Amer. Chem. Soc., 1958, 80, 6098.

[31] R.V. LEMIEUX, J.D. STEVENS
Can. J. Chem., 1966, 44, 249.

[32] R.W. LENZ, J.P. HEESCHEN
J. Polym. Sci., 1961, 51, 247.

[33] R.V. LEMIEUX, J.D. STEVENS
Can. J. Chem., 1965, 43, 2059.

[34] A.S. PERLIN
Can. J. Chem., 1966, 44, 539.

[35] O.L. CHAPMAN, R.W. KING
J. Amer. Chem. Soc., 1964, 86, 1256.

[36a] B. CASU, M. REGGIANI, C.G. GALLO, A. VIGEVANI
Tetrahedr. Lett. 1964, 2839.

[36b] B. CASU, M. REGGIANI, C.G. GALLO, A. VIGEVANI
Tetrahedr. Lett. 1965, 2253.

[37] D. HORTON, W.N. TURNER
J. Org. Chem., 1965, 30, 3387.

[38] L.D. HALL, L. HOUGH, S.H. SHUTE, T.J. TAYLOR
J. Chem. Soc., 1965, 1154.

[39] D. HORTON
J. Org. Chem., 1966, 29, 766.

[40] D. HORTON, J.B. HUGHES, J.S. JEWELL, K.D. PHILIPS,
W.N. TURNER
J. Org. Chem., 1967, 32, 1073.

[41] D. HORTON, W.E. MAST, K.D. PHILIPS
J. Org. Chem., 1967, 32, 1471.

[42] D. HORTON, J.H. LAUTERBACK
J. Org. Chem., 1969, 34, 86.

[43] K. HEYNS, W.P. TRAUTWEIN, F. GARRIDO, ESPINOSA
Angewand. Chem. Int. ED. 1967, 6, 955.

[44] B. CASU, M. REGGIANI, G.G. GALLO, A. VIGEVANI
Carbohyd. Res., 1970, 12, 157.

[45] D. GAGNAIRE, L. ODIER
Carbohyd. Res., 1969, 11, 33.

[46] V.S.R. RAO, J.F. FOSTER
J.Phys. Chem., 1963, 63, 951.

[47] L.D. HALL
Adv. in Carbohyd. Chem., 1965, 19, 82.

[48] B. CASU
Chim. Ind. Milan, 1966, 48, 921.

[49] A. HYBL, R.E. RUNDLE, D.E. WILLIAMS
J. Amer. Chem. Soc., 1965, 87, 2779.

[50] B. CASU, M. REGGIANI
J. Polym. Sci. PtC, 1964, 7, 171.

CHAPITRE I

SPECTRES DES ACETATES DE CELLULOSE

La réaction d'acétylation de la cellulose est en général incomplète, et donne des acétates de cellulose dont le degré de substitution varie de 0,5 à 2,5. Les acétates les plus courants sont ceux qui sont solubles dans l'acétone et dont le DS varie de 2,2 à 2,5. Dans certaines conditions, la réaction d'acétylation est complète et conduit au triacétate (DS = 3), qui est alors soluble dans le chloroforme.

La R.M.N. a déjà été utilisée en haute résolution, pour les polymères synthétiques [1, 2, 3, 4, 5].

Bien que la finesse des raies ne soit pas alors celle des composés à structure définie, les spectres obtenus permettent des conclusions intéressantes sur la structure des polymères.

Cependant, pour la cellulose, ou les dérivés cellulosiques, cette méthode n'a pas jusqu'ici été appliquée avec succès ce qui provient de différents facteurs, parmi lesquels, on peut citer :

a) l'insolubilité relative de la cellulose et de ses dérivés dans les solvants non protonés habituels,
b) l'analogie très grande entre les différents protons. Par exemple, dans la cellulose tous les protons sont fixés directement sur un oxygène (groupe OH), ou en α d'un oxygène, celui-ci étant ou non un hydroxyle. Les déplacements chimiques attendus sont donc voisins, et les renseignements tirés des spectres a priori peu intéressants.
c) dans la mesure où une certaine solubilité existe, la viscosité des solutions augmente très rapidement, ce qui diminue la résolution que l'on peut attendre.

1 - Spectre de l'acétate de cellulose dans l'acétone deutériée

Si l'on effectue par exemple le spectre à 60 MHz d'une solution d'acétate de cellulose (50 mg) dans l'acétone deutériée (0,5 cm^3), celui-ci est constitué de bandes assez larges (figure 1).

On peut cependant y noter :

a - Les protons des groupes acétate ($\delta \simeq 2$ ppm). Il s'y superpose les protons de l'acétone non totalement deutériée.

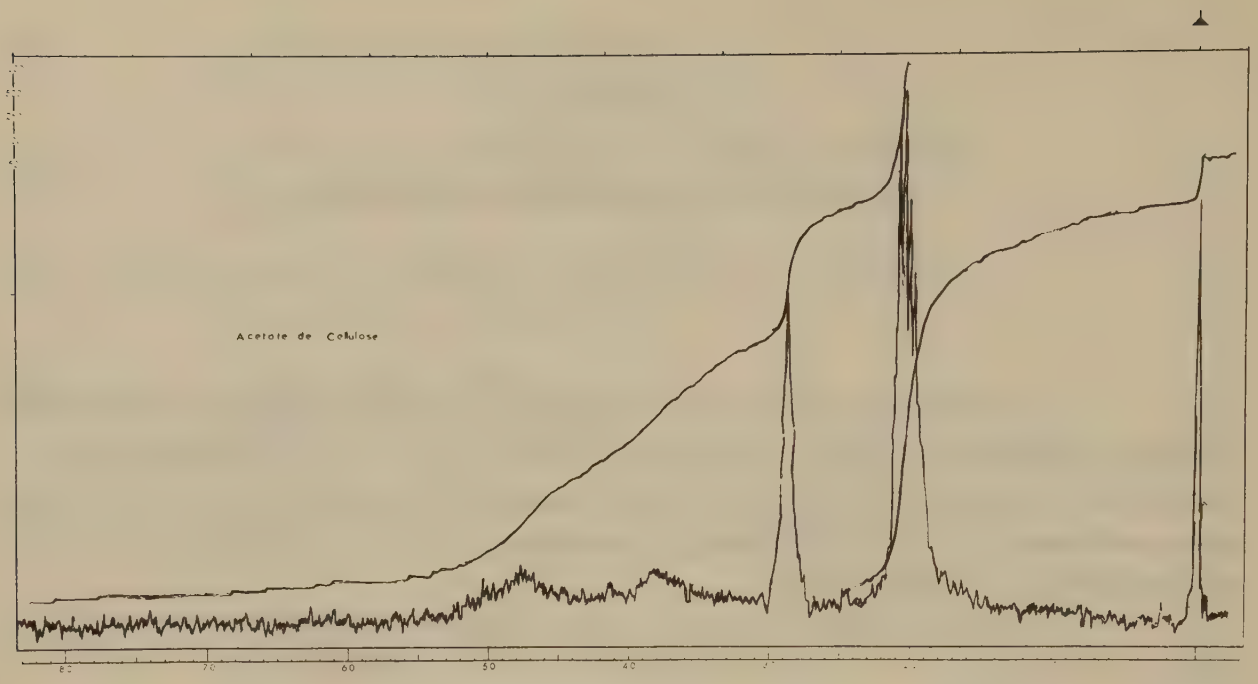


Figure 1 - Spectre de l'acétate de cellulose à 60 MHz.

Le signal de ces groupes acétates est très compliqué, car du fait que le polymère est un corps non défini, ayant une répétition statistique des groupes acétates, il y a huit possibilités en ce qui concerne l'unité glucose dans la chaîne. En effet on peut avoir :

- 1 unité glucose sans acétate donc ayant trois OH
- 3 unités glucose différentes portant un groupe acétate, soit :
  - 2 - OAc
  - 3 - OAc
  - 6 - OAc
- 3 unités glucose différentes portant deux groupes acétates :
  - 2 - OAc + 3 - OAc
  - 2 - OAc + 6 - OAc
  - 3 - OAc + 6 - OAc
- 1 unité glucose avec trois acétates.

De ces huit possibilités, on peut tirer douze types de méthyles différents en R.M.N. :

- 3 méthyles différents dans l'unité monosubstituée.
- 6 méthyles différents dans l'unité disubstituée.
- 3 méthyles dans l'unité trisubstituée.

La résonance des pics méthyles des groupes acétates est la superposition de ces douze types de méthyle, ce qui explique la complexité du spectre observé dans cette région.

b) Les protons des groupes OH ($\delta \simeq$ 2,75 ppm)

Cette bande est déplaçable par addition d'acide trifluoroacétique, par exemple. On doit noter qu'il existe, dans cette même bande, les protons des groupes OH de la cellulose, et les protons de l'eau contenue dans l'échantillon ou le solvant, sous quelle que forme qu'elle soit (eau libre ou eau liée).

c) Les autres protons situés en α des OH ou des autres protons de la molécule ($\delta \simeq$ 3 à 5,3 ppm).

Cette bande présente deux domes principaux sans aucune structure, et on ne peut envisager d'y distinguer les différents types de protons.

Pour augmenter la résolution en diminuant la concentration (jusqu'à 10 mg pour 0,5 cm^3 par exemple), on se heurte à une difficulté due au bruit de fond.

Cette difficulté apparaît cependant par utilisation d'un analyseur multicanaux permettant de décrire N fois le même spectre en ajoutant dans chaque canal le signal de l'un des passages (CAT). Cette technique a été utilisée dans d'autres cas [6, 7, 8], et le but de ce travail est de montrer les résultats de son application dans le cas de dérivés cellulosiques.

Avec l'acétate de cellulose dilué, et environ 100 passages, on obtient un spectre où le bruit de fond a pratiquement disparu. La figure 2 donne, en particulier, le résultat obtenu pour le groupe des protons situés en α des oxygènes (δ = 3 à 5,3 ppm), ainsi que la courbe intégrée correspondante.

Avant de discuter cette partie du spectre, on peut noter les résultats suivants obtenus sur le spectre total et par intégration :

a - La quantité des protons dus aux groupements acétyles ne peut être déterminée de façon satisfaisante, les protons de l'acétone non totalement deutériée étant trop forts ; ce sont d'ailleurs eux qui donnent la structure fine observée sur ce spectre (l'acétone $CHD_2 COCD_3$ ayant un spectre à 5 raies d'intensité 1.2.3.2.1 correspondant au couplage du proton aux deux deutérium équivalents).

b - La quantité de groupe OH est approximativement la même que celle des protons portés par des carbones situés en α d'oxygènes, c'est-à-dire sept protons. L'échantillon utilisé à un DS moyen de 2,2 il reste donc en moyenne 0,8 OH par glucose. On trouve donc qu'il y a 6,2 OH n'appartenant pas à l'acétate de cellulose et qui viennent donc de l'eau. On peut donc dire qu'il a approximativement trois molécules d'eau par unité anhydroglucose dans cet échantillon, dans les conditions normales d'un laboratoire non climatisé. Nous avons vérifié que dans les mêmes conditions, les traces d'eau dans le solvant n'étaient pas détectées par la R.M.N. Rappelons qu'aucun renseignement ne peut être donné sur la nature de ces protons dans le spectre effectué en haute résolution, contrairement à la Résonance Magnétique Nucléaire "large bande", où les différents types de OH peuvent être distingués.

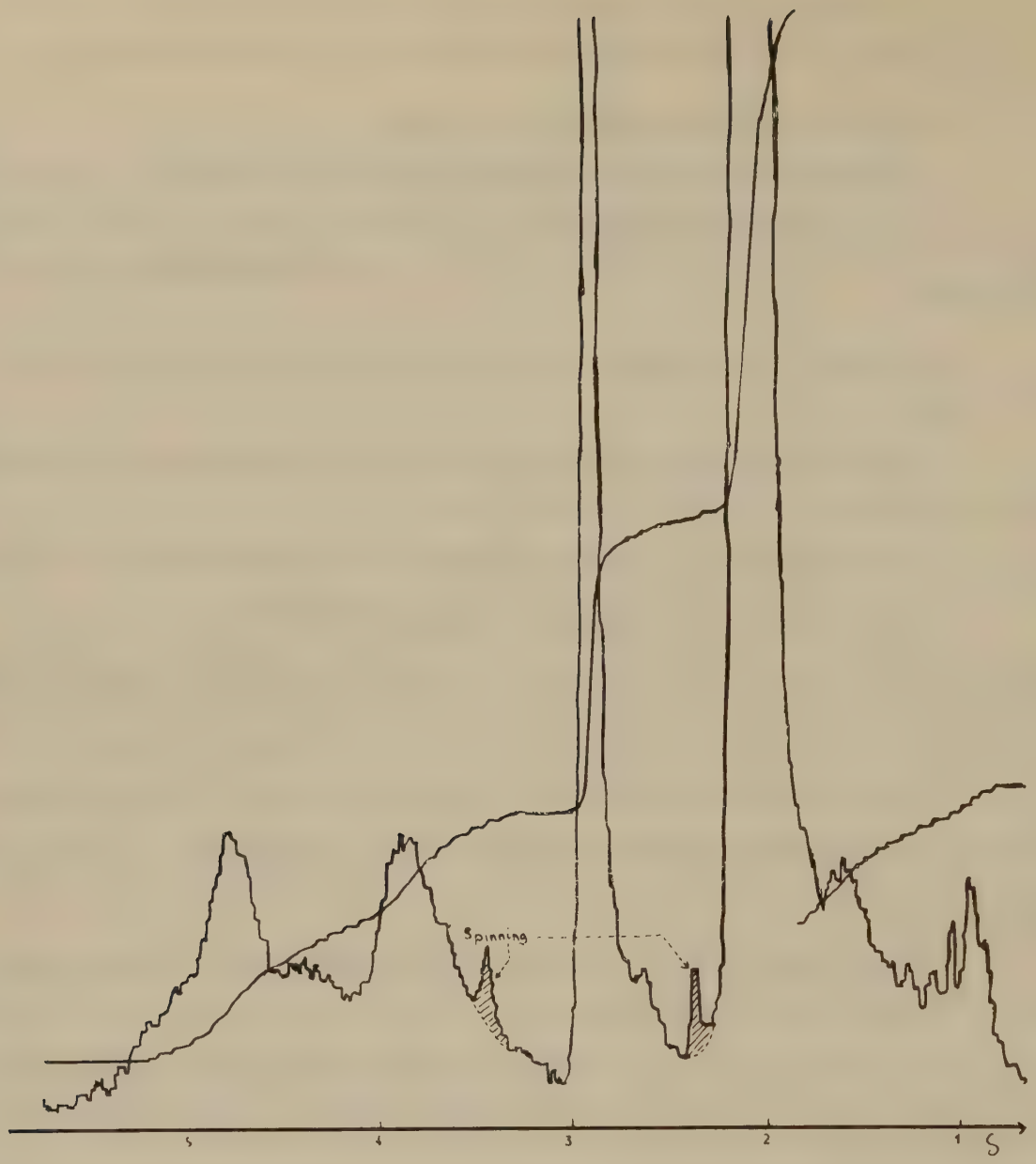


Figure 2 - Spectre de l'acétate de cellulose à 60 MHz après 100 passages.

c - Vers les déplacements faibles ($\delta \simeq 1$ ppm) se trouvent des impuretés que l'on doit attribuer à des groupements portés par des carbones qui ne sont pas situés en α d'atomes d'oxygène (donc des méthyles ou les méthylènes "aliphatiques"). Leur quantité, calculée en prenant comme unité celle qui conduit à sept protons en α des oxygènes est de un proton environ. Ceci revient à dire qu'il existe en moyenne un proton "aliphatique" pour une unité glucose de l'échantillon considéré (produit commercial FLUKA, utilisé sans purification ni séchage).

Nous avons vu sur l'exemple de l'acétate, l'intérêt de la technique d'accumulation des spectres sur un analyseur multicanaux. En effectuant maintenant le même spectre à 100 MHz nous allons voir les avantages que peut apporter de R.M.N. à haut champ, par rapport à la R.M.N. classique.

En effectuant le spectre de 30 mg d'acétate Eastman Kodak (39, 8 - 3) dans 0, 5 cm^3 d'acétone deutériée avec une trentaine de passages, nous obtenons le spectre de la figure 3. Par rapport à la figure 2, le bruit de fond a encore diminué, bien que l'on ait fait trois fois moins de passage, et les différents pics sont beaucoup plus séparés les uns des autres. En particulier les bandes latérales de "spinning" du pic OH ne se superposent plus au spectre des protons du cycle. A 4, 95 ppm apparaît un pic séparé du massif de protons et dont l'intensité mesurée par intégration est de un proton. Nous voyons d'autre part sur ce spectre que l'acétate est très pur, car la quantité de protons aliphatiques est très faible par rapport à l'échantillon précédent.

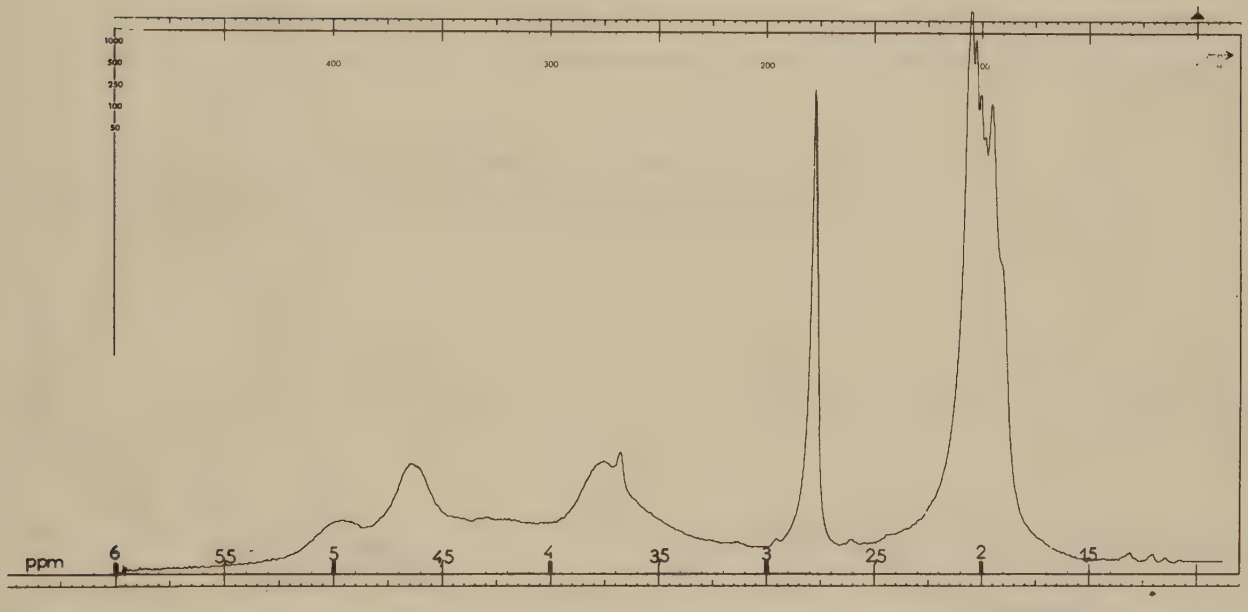


Figure 3 - Spectre de l'acétate de cellulose à 100 MHz (30 passages).

D'autre part, l'intégration du pic OH indique qu'il y a un seul proton OH, pour cet échantillon de DS moyen 2, 45, c'est-à-dire qu'il n'y a que 0, 45 OH venant de l'eau dans les mêmes conditions que précédemment. Cela indique que suivant les conditions de préparation et de conservation, la quantité d'eau dans les acétates de cellulose varie très fortement de trois molécules d'eau par unité-glucose, pour l'échantillon FLUKA à 0, 2 molécule d'eau pour l'échantillon Kodak.

2 - Spectre du triacétate de cellulose dans le chloroforme deutérié

a) Spectre du triacétate de cellulose

En opérant dans des conditions analogues, une solution de 10 mg de triacétate de cellulose commercial (Rhodiacéta) en solution dans 0,5 cm^3 de chloroforme deutérié, donne le spectre de la figure 4, après 100 passages.

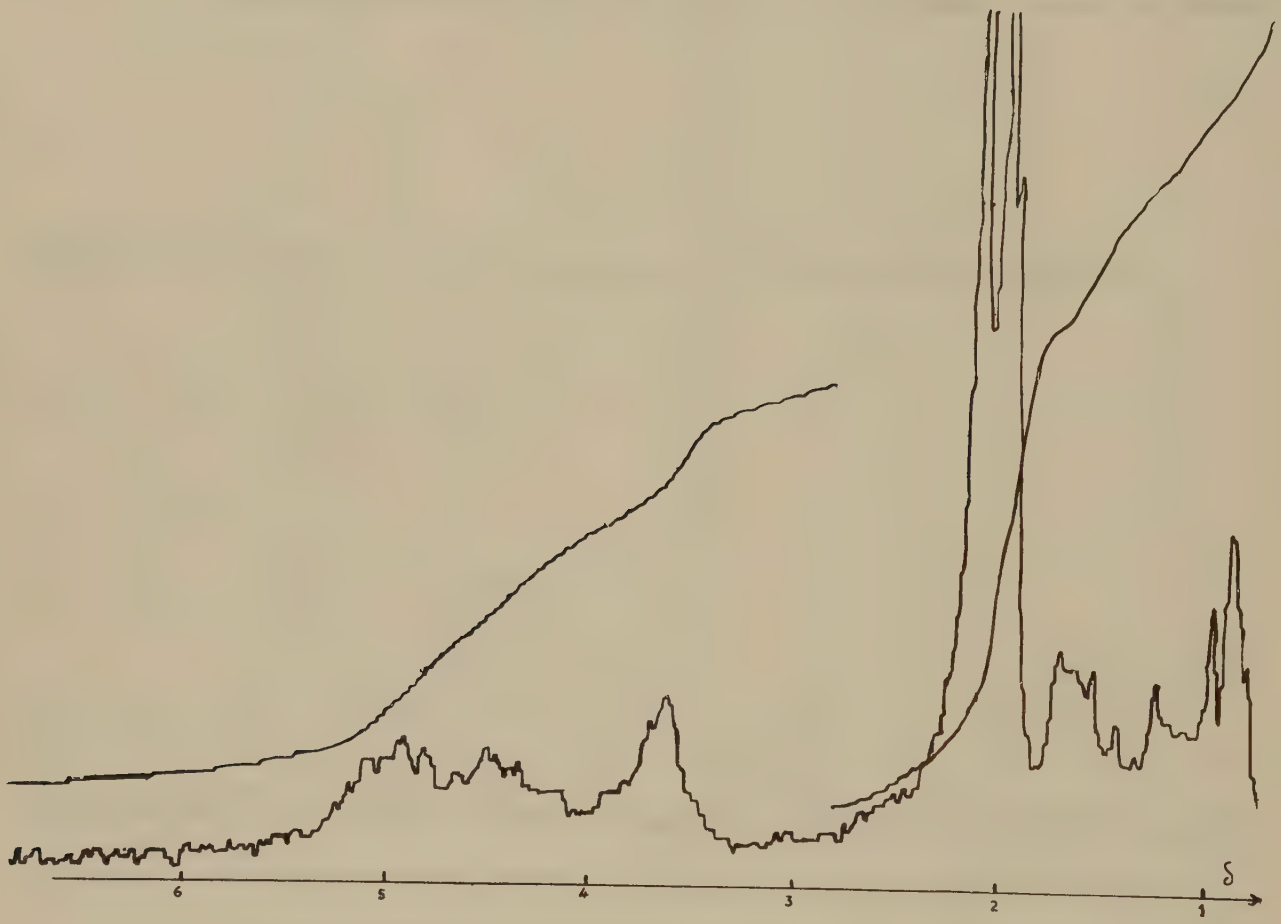


Figure 4 - Spectre du triacétate de cellulose à 60 MHz (100 passages)

On y note immédiatement :

- la disparition des groupes OH (groupes hydroxyles de la cellulose et eau) : l'addition d'acide trifluoroacétique n'a pas d'influence.
- une structure différente de celle obtenue dans le cas de l'acétate de cellulose pour les protons en α des oxygènes (δ = 3,3 à 5,5 ppm) ; ce point sera discuté dans le paragraphe suivant.
- des impuretés "aliphatiques" importantes (δ = 0,9 à 1,8 ppm).

La quantité totale de ces protons est de 5,8, c'est-à-dire un groupe $-CH_2-CH_3$ par unité anhydroglucose.

Nous avons préparé également du triacétate de cellulose à partir d'acétate Eastman Kodak, par peracétatylation dans le mélange acide acétique-anlydride acétique et acide perchlorique.

Le spectre effectué dans $CDCl_3$ à 100 MHz donné par la figure 5, a été obtenu après 30 passages. L'agrandissement des trois pics méthyles dus aux trois sortes d'acétates est donné par la figure 6. On voit sur cette figure la possibilité de séparer nettement les trois pics qui se trouvent à 2,17 , 2,05 et 1,99 ppm.

Cette partie du spectre permet donc de donner la possibilité de déterminer le degré de substitution de l'acétate considéré, et d'autre part de vérifier par intégration que les trois positions sont bien entièrement substituées, par comparaison des 7 protons du cycle avec les 9 protons des groupes acétates.

Les protons du cycle compris entre 5,25 et 3,35 ppm, dont l'agrandissement est donné par la figure 7 se décomposent en cinq massifs de la manière suivante, le total correspondant à sept protons :

- un triplet centré à 5,06 ppm, représentant un proton (J = 7,5 Hz)
- un triplet centré à 4,80 ppm, représentant un proton (J = 7,5 Hz).

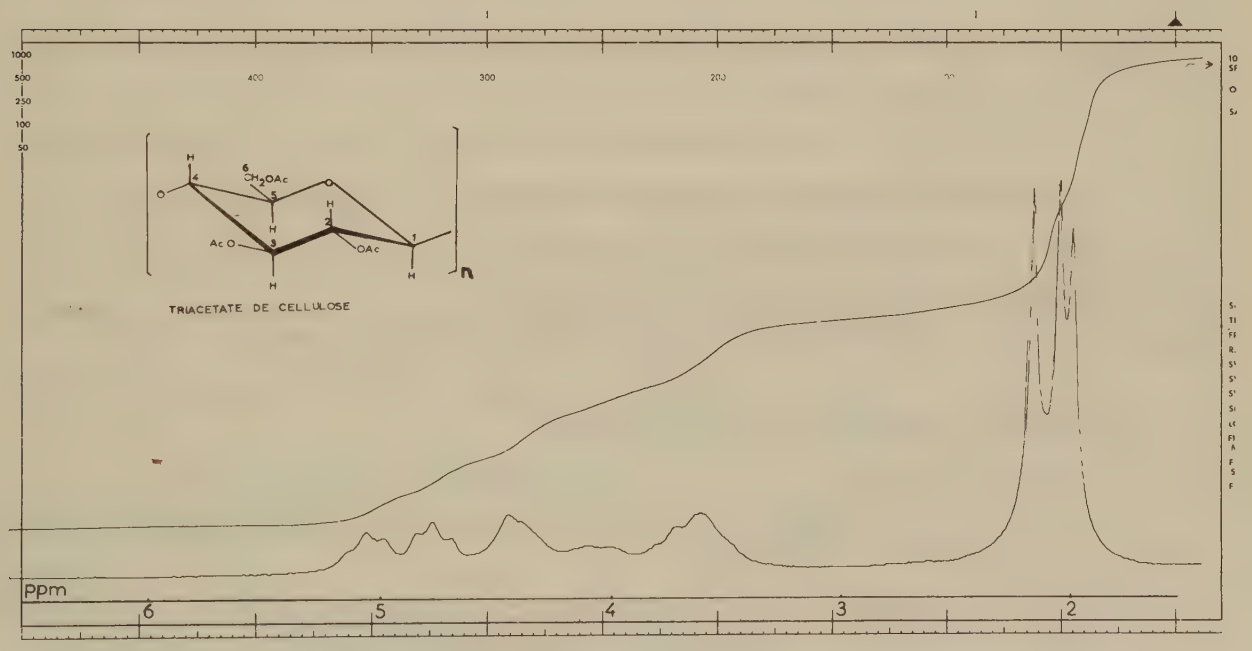


Figure 5 - Spectre du triacétate de cellulose à 100 MHz (30 passages).

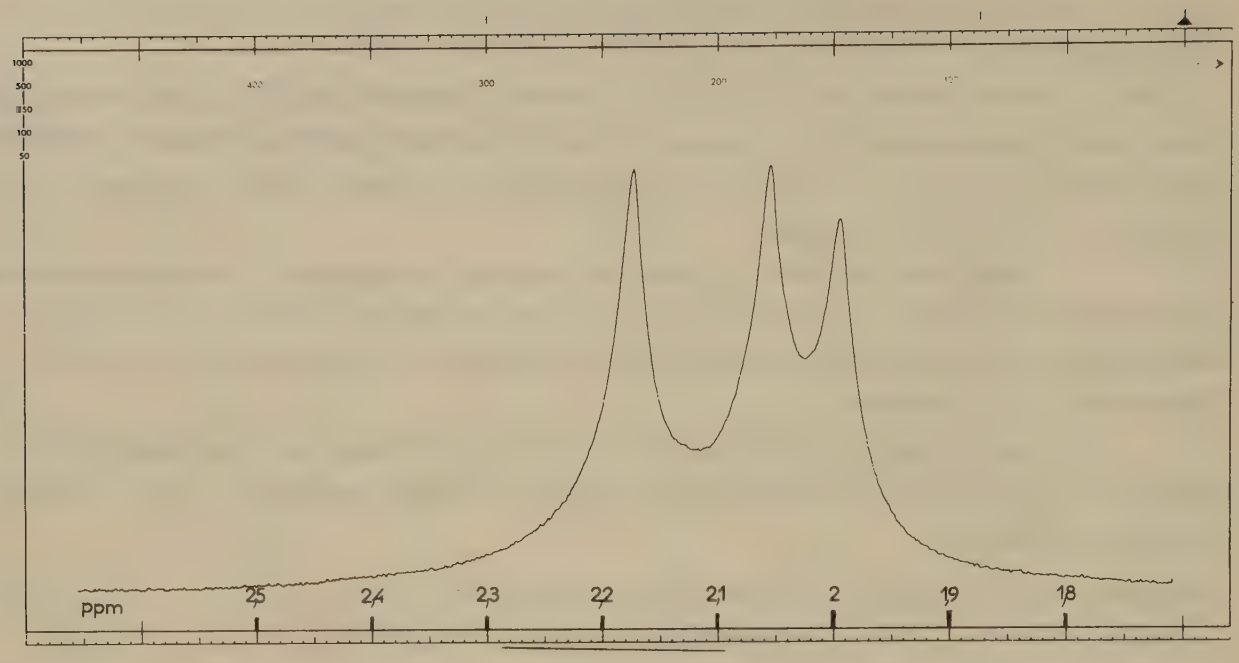


Figure 6 - Spectre du triacétate de cellulose : agrandissement des pics méthyles des groupes acétates.

Ces deux triplets ont un aspect assez voisin :

- un pic centré à 4,44 ppm représentant deux protons,
- un pic complexe vers 4,10 ppm représentant un proton,
- enfin, un pic large vers 3,60 ppm représentant les deux derniers protons.

b) Structure des protons situés en α de l'oxygène

C'est le point a priori le plus intéressant, car susceptible de généralisation dans toute la chimie des dérivés cellulosiques.

Pour simplifier, on donnera dans la suite aux protons le numéro du carbone auquel ils sont liés ; il y a donc deux protons 6, et un de chaque autre espèce [1, 2, 3, 4, 5].

Dans le triacétate de cellulose, il existe donc sept protons qui peuvent être groupés en cinq catégories :

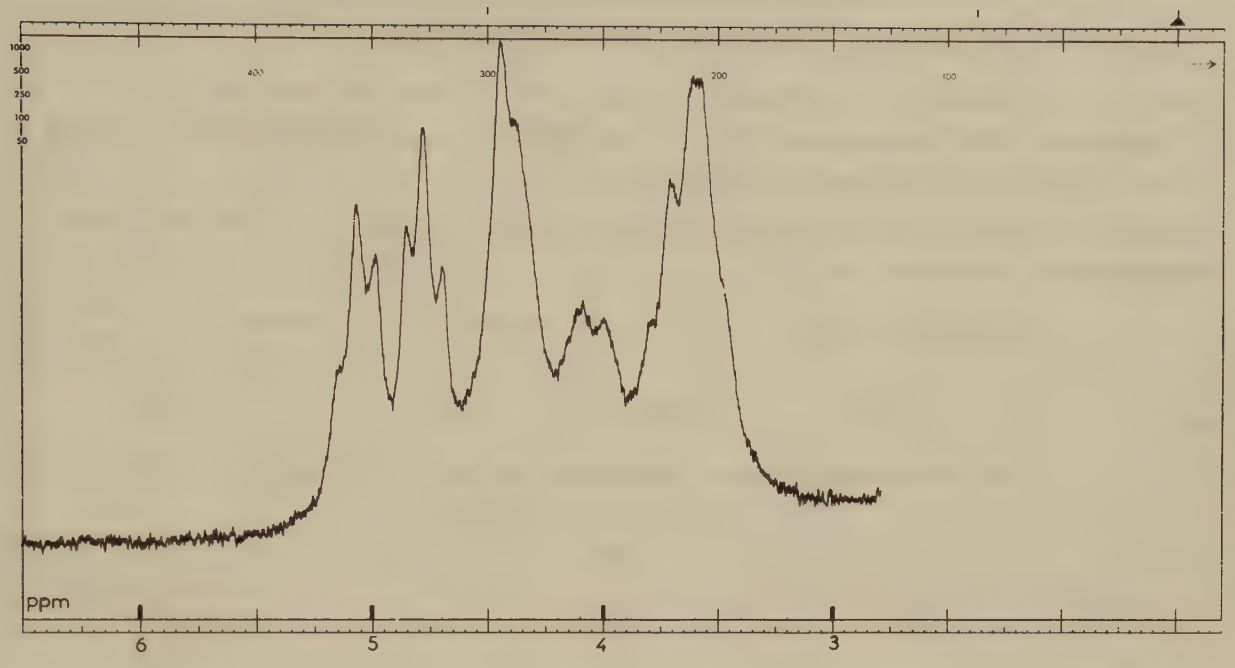


Figure 7 - Triacétate de cellulose : protons du cycle.

- les deux protons 6 (protons en α d'un groupe acétate primaire R-CH_2-O Ac).
- les deux protons 2 et 3 (protons en α d'un groupe acétate secondaire R-CHOAc -R').
- le proton 1, porté par un carbone fixé à deux oxygènes $\begin{matrix} RO \\ R'O \end{matrix}\!\!>\!\!CH - R''$
- le proton 4, porté par un carbone fixé à un oxygène réunissant les cycles, $R - O - CH\!<\!\begin{matrix} R' \\ R'' \end{matrix}$
- le proton 5, porté par un carbone, fixé à un oxygène hétérocyclique $R - \underset{\llcorner\!\!\lrcorner}{CH - O}$

Pour l'acétate de cellulose, les protons sont de même nature sauf pour ceux correspondant aux groupes hydroxyles non acétylés, ce qui donne deux nouvelles catégories de protons :

- les protons 6 en α d'un alcool primaire (R CH_2OH)
- les protons 2 et 3 en α d'un alcool secondaire (R CHOH R').

Ces derniers correspondent statistiquement dans le cas de l'acétate Eastman Kodak (DS = 2,45) à 18 °/$_o$, des protons des deux premières classes considérées (protons en α d'un groupe acétate).

Le spectre correspondant (voir figure 3) comporte cinq massifs principaux d'intensités relatives approximatives 1.2.1.2 et 1, les deux derniers étant très mal séparés (épaulements).

Sur ces données résumées dans le tableau I, on peut suggérer des attributions pour tenir compte des faits suivants, relatifs aux déplacements chimiques :

- L'acétylation d'un groupe OH conduit à un déplacement supérieur du proton en α.
- Le déplacement chimique des protons 1 doit être supérieur aux déplacements des protons 4 et 5 (influence directe de deux oxygènes au lieu d'un).
- Les protons des acétates primaires sont moins déplacés que ceux des acétates secondaires et de même pour les alcools.

Les attributions qui en résultent sont indiquées dans le tableau II.

TABLEAU I

Déplacements chimiques et intensités relatives approximatives des groupes de protons observés

δ (ppm)	4,95	4,65	4,4 à 4	3,8	3,7
Acétate	1	2	1	2	1
δ (ppm)	5,06	4,80	4,44	4,1	3,6
Triacétate	1	1	2	1	2

La possibilité d'interprétation des spectres de résonance magnétique en haute résolution est nettement améliorée par l'utilisation d'un analyseur multicanaux permettent d'utiliser des solutions diluées peu visqueuses et surtout par l'application de la R.M.N. à 100 MHz.

Ceci a été confirmé récemment par l'interprétation complète du spectre du triacétate de cellulose à 220 MHz [9] où tous les protons sont séparés. L'attribution qui a été faite par KEILICH est en accord avec les propositions que nous avons faites sur les spectres à 60 MHz [10] et à 100 MHz [11].

Le spectre du triacétate effectué à 250 MHz sur l'appareil expérimental THOMSON C.S.F. TSN-250 dans $CDCl_3$ est donné par la figure 8. L'attribution est faite sur la figure, on voit que les protons H_3, H_2 et H_4 sortent sous forme de triplets, d'écart J = 7 à 8 Hz confirmant ainsi la position diaxiale de ces différents protons sur un cycle en forme chaise.

Le proton H_1 n'est couplé qu'au proton H_2 et sort sous forme d'un doublet. Les deux protons H_6 forment la partie AB d'un système ABX constitué par les protons H_6 , H_6' et H_5.

TABLEAU II

Attribution effectuée pour les différents protons

δ (ppm)	5, 06	4, 95	4, 80	4, 65	4, 44	4, 2	4, 1	3, 8	3, 7	3, 6
Acétate		Protons 2 ou 3 (OAc)		Protons 3 ou 2 (OAc) Proton1		Proton6 (OAc) Protons 2 et 3 (OH)		Protons 4 ou 5 Proton6 (OH)	Protons 5 ou 4	
Intensité théorique		1		2		1		2	1	
Tri-acétate	Protons 2 ou 3		Protons 3 ou 2		Protons 1 et 6		Protons 1 ou 6			Protons 4 et 5
Intensité théorique	1		1		2		1			2

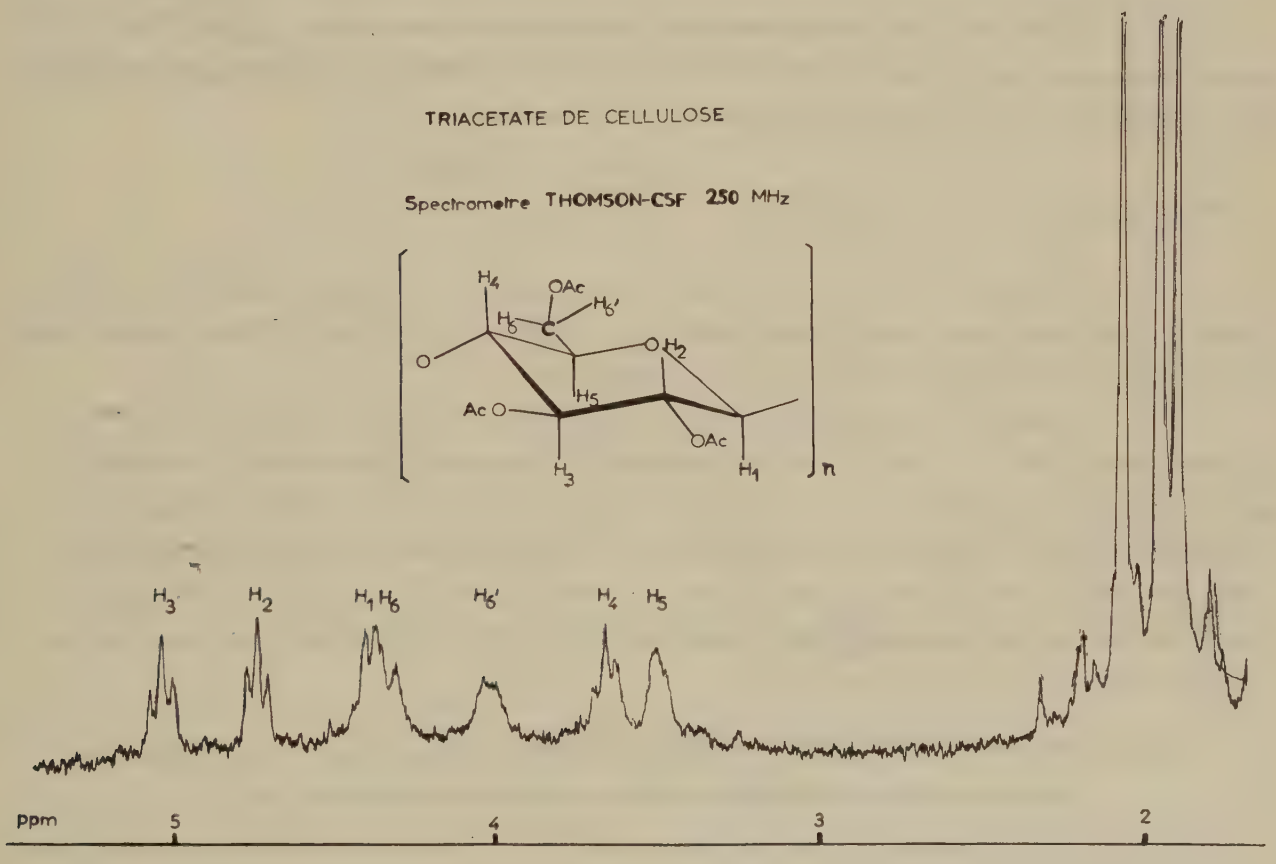


Figure 8 - Spectre du triacétate de cellulose à 250 MHz.

Le proton H_5 forme la partie X du même système mais est plus dédoublé par le couplage avec H_4 .

Si l'on compare les spectres du triacétate de cellulose donnée par les figures 4, 5 et 8 effectués respectivement à 60 MHz avec 100 passages, à 100 MHz avec 30 passages et à 250 MHz avec un seul passage, on note le gain d'information obtenu par l'évolution de la technique sur une période de quelques années.

A partir de la connaissance des spectres R. M. N. de l'acétate et du triacétate de cellulose, nous allons voir les possibilités d'application que l'on peut en tirer.

3 - Dosage par R. M. N. du taux d'acétylation d'acétates de cellulose

La méthode de dosage classique des groupes acétyles de l'acétate de cellulose est celle d'EBERSTADT [12] modifiée ultérieurement [13] . Elle s'appuie sur la saponification à la soude, l'addition d'acide chlorydrique en excès, et dosage en retour.

Les inconvénients de ce dosage sont triples :

- reproductibilité difficile, le résultat dépendant en particulier des conditions exactes,
- dosage effectué en phase hétérogène,
- temps d'un dosage assez long (trois jours ou plus).

La R. M. N. permettant d'effectuer un spectre de l'échantillon mis en solution, donne une analyse sûre et rapide. Le but de ce travail est de préciser les conditions de ce dosage et la comparaison des résultats avec la méthode traditionnelle.

a) Résultats

Les spectres de R. M. N. d'acétate de cellulose sont de bonne qualité et interprétables si l'on utilise un analyseur multicanaux pour permettre l'emploi de solutions diluées moins visqueuses, avec un rapport signal sur bruit satisfaisant.

Comme il s'agit ici d'un dosage, les concentrations peuvent être choisies plus grandes (40 mg pour 0, 5 cc de solvant par exemple) et le résultat, quoique moins précis est satisfaisant sans l'utilisation de l'analyseur multicanaux. Les groupements OH restants sont déplacés par addition d'acide trifluoroacétique pour les amener dans une région du spectre ne contenant pas d'autres protons (en général entre 5, 5 et 6, 5 ppm). On mesure alors le rapport des aires des pics correspondants aux groupes acétates (n_a à 2 ppm environ) et de ceux des sept protons du cycle (n_c entre 5, 5 et 3 ppm).

Le degré de substitution **x** est donné par $x = \frac{7\, n_a}{3\, n_c}$.

Les échantillons d'acétates de cellulose utilisés sont les suivants :

- échantillon commercial (Prolabo, DS = 2, 4),
- produits d'hydrolyse partielle de ce dernier pour les degrés de substitution inférieurs (voir Partie Expérimentale) [14] ,

- produits d'acétylation [15] du même acétate avec l'acide sulfurique ou perchlorique, pour les degrés de substitution compris entre 2,4 et 3.

Le solvant utilisé est le chloroforme deutérié pour les degrés de substitution élevés (DS compris entre 2,5 et 3), la pyridine pour les valeurs moyennes (DS compris entre 1 et 2,5), puis l'eau lourde pour les acétates très hydrolysés (DS inférieur à 1). Dans le cas de l'acétate soluble, dans l'acétone, la pyridine remplace l'acétone deutériée, pour éliminer les traces de protons du solvant sous les pics acétates. Cette méthode de dosage s'est révélée très satisfaisante en ce qui concerne les points suivants :

- nécessité d'une quantité d'échantillon très faible (30 mg environ, ou même beaucoup moins par l'emploi d'un analyseur multicanaux).
- temps nécessaire au dosage très faible.
- bonne reproductibilité.

b) Discussion

La comparaison entre les résultats obtenus par la méthode précédente et par la méthode traditionnelle [13] est schématisée sur la figure 9 donnant le degré de substitution obtenu de la façon habituelle (DS_{SAPON}) en fonction du degré de substitution obtenu par la R.M.N. ($DS_{R.M.N.}$). On y note que les valeurs obtenues ne sont pas concordantes, les points expérimentaux étant situés au-dessous de la première bissectrice.

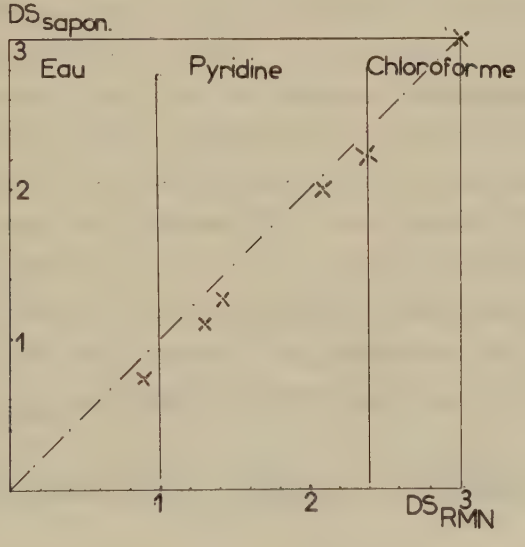


Figure 9 - Comparaison des résultats obtenus par R.M.N. et par voie chimique au cours du dosage des taux d'acétylation.

Les différences peuvent atteindre 0,2 ce qui est nettement supérieur aux erreurs expérimentales des deux méthodes. Une explication possible est que la saponification ne soit pas totale dans la méthode habituelle, réalisée en milieu hétérogène, et donne une valeur par défaut du degré de substitution.

Nous avons voulu vérifier le résultat donné par R.M.N. en effectuant un dosage des hydroxyles non acétylés. Le dosage direct de l'aire des pics correspondant aux OH s'est révélé fort délicat : on se heurte aux mêmes difficultés que dans le cas de la lignine [16]. On a donc cherché à substituer ces OH par un réactif dont les protons sont distincts en R.M.N. de ceux de l'acétate de cellulose.

Il est connu que le phényl isocyanate en excès réagit d'une manière complète sur les groupes OH restants de l'acétate de cellulose [17] suivant la réaction :

$$\text{Cell-OH} + C_6H_5 - N = C = O \qquad \text{Cell} - O - \underset{\underset{O}{\|}}{C} - NH - C_6H_5$$

Sur un échantillon d'acétate non complètement acétylé (DS = 2,4) nous avons fait réagir un excès de phényl isocyanate (trois fois la quantité théorique nécessaire) à 100°C pendant 70 heures dans la pyridine.

Le spectre R.M.N. du produit obtenue est analogue à celui de l'acétate de départ, avec en plus un massif de protons aromatiques vers 7,2 ppm. Le proton fixé sur l'atome d'azote n'apparaît pas directement sur le spectre et est donc caché sous un massif d'autres protons.

Le rapport du massif des 7 protons du cycle anhydroglucose et du massif des protons aromatiques donne 3,9 protons pour ce massif, après soustraction des protons dûs au chloroforme deutérié, utilisé comme solvant.

Nous avons démontré la présence du proton fixé sur l'atome d'azote sous le pic des protons aromatiques, par échange avec le méthanol deutérié CD_3OD. L'introduction d'un large excès de méthanol est suivie de l'apparition d'un pic vers 3 ppm dû à l'échange N-H-OD. L'intégrale de ce pic est égale à la diminution de celle des protons aromatiques.

L'addition ultérieure de méthanol ne change pas le rapport des différents protons.

On doit donc pour le calcul tenir compte du fait que le proton fixé sur l'atome d'azote a un déplacement chimique analogue à ceux des protons aromatiques et compter 6 protons pour chaque OH substitué. On obtient alors 0,65 hydroxyle libre par unité anhydroglucose, ce qui correspond à un DS = 2,35 assez voisin de la valeur 2,4 trouvée par la méthode directe.

Cette possibilité d'opérer après substitution n'est pas meilleure que la méthode directe. Il n'y a que pour les DS très voisins de 3 qu'elle peut apporter une meilleure précision, chaque proton OH étant substitué par un groupement à 6 protons.

4 - Dosage par R.M.N. du taux de greffage dans un copolymère cellulose-polystyrène

On sait que l'action de rayons γ sur la cellulose crée des radicaux libres stables mis en évidence par Résonance Paramagnétique électronique [18, 19, 20]. Si on met en contact la cellulose en cours d'irradiation avec un monomère vinylique on obtient un copolymère [21, 22].

Les copolymères greffés de la cellulose sont toujours insolubles et ne peuvent donc être étudiés par les méthodes physiques en solution. Une méthode intéressante pour solubiliser ces polymères a été introduite par KOBAYASHI [22] par acétylation du support cellulosique. On

obtient alors un produit soluble qui, après extraction au benzène, pour éliminer les chaînes de polystyrène libre, libérées par l'acétylation et la mise en solution, donne un copolymère acétylé et extrait (CAE) . Nous avons décrit par ailleurs, l'obtention d'un tel copolymère cellulose-polystyrène [24, 25] et nous voulons ici, simplement mettre en évidence l'intérêt de la R. M. N. dans l'étude de tels composés.

a) Spectres de R. M. N.

Les solutions du copolymère acétylé dans le chloroforme deutérié deviennent rapidement très visqueuses, et aucun spectre correct ne peut en être effectué.

L'utilisation d'un analyseur multicanaux et une centaine de passages successifs permettent l'utilisation de solutions plus diluées : la figure 10 montre un exemple de spectres obtenu en 120 passages à partir d'une solution de 10 mg de copolymère C_{AE} dans 0, 5 cc de chloroforme. Le spectre résultant d'un seul passage est donné sur la même figure à titre indicatif.

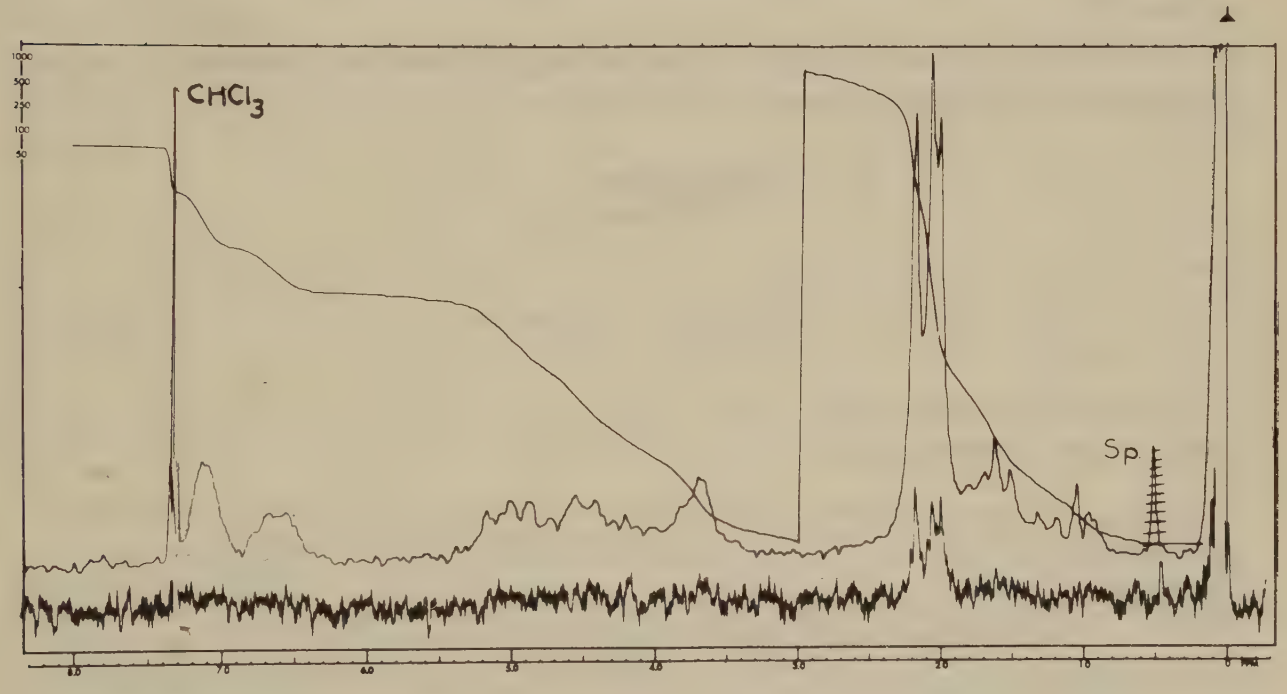


Figure 10 - Spectre du copolymère greffé triacétate de cellulose polystyrène à 60 MHz.

L'interprétation globale du spectre est très simple :

- entre δ = 0,8 et 1,8 ppm, se trouvent les protons "aliphatiques" du polystyrène (-CH-CH_2)
- vers δ = 2 ppm, les protons des groupements acétates divisés en deux pics (intensités relatives 1 et 2)
- entre δ = 3 ppm et δ = 5,3 ppm, apparaissent les protons situés en α des groupes acétyles : la structure fine qui apparaît est parfaitement reproductible et très semblable à celle du triacétate de cellulose (sept protons par cycle anhydroglucose)
- enfin, entre 6 et 7 ppm, se trouvent les protons aromatiques du polystyrène (5 protons par noyau aromatique).

Les premiers résultats que l'on peut en déduire sont les suivants :

. Le spectre est identique à celui que donnerait un mélange de triacétate de cellulose et de polystyrène. Ceci signifie que les modifications qui se produisent au voisinage des points de greffage sont trop peu importantes pour être décelées par cette méthode.

. On dispose d'un moyen de dosage excellent du rapport entre les unités anhydroglucose et styrène présentes dans le copolymère étudié : il suffit de doser par intégration le rapport entre le nombre de protons aromatiques n_a et le nombre de protons "cellulosiques" n_c en α des groupes OAc.

On obtient par exemple le taux de greffage de l'échantillon considéré, par l'expression suivante, si la définition du taux de greffage est :

$$\sigma = \frac{\text{m Polystyrène}}{\text{m Cellulose}}$$

$$\sigma = \frac{n_a}{n_c} \times \frac{7}{5} \times \frac{104}{162} \times 100$$

104 : masse de l'unité styrène

162 : masse de l'unité glucose

Le taux obtenue pour le copolymère considéré (σ = 37 °/$_o$ environ) correspond approximativement à celui que l'on peut calculer à l'aide des poids des différentes étapes de préparation.

L'intérêt principal de cette mesure est qu'elle peut se faire sur tout échantillon soluble d'acétate de cellulose greffé par du polystyrène en opérant sur de faibles quantités, et ceci sans destruction. Un exemple d'utilisation a consisté en la possibilité de suivre de fractionnement de ce copolymère et de démontrer son homogénéité.

b) Fractionnement du copolymère

Plusieurs auteurs se sont penchés sur le problème du fractionnement des copolymères greffés de la cellulose ou des dérivés cellulosiques. Dans le cas du copolymère acétate-

styrène, HACHIHAMA [26] après avoir extrait le polystyrène par le benzène, extrait l'acétate de cellulose non greffé par l'acétone ; puis il recommence ainsi ce cycle trois ou quatre fois et appelle copolymère greffé le produit insoluble après ces multiples extractions.

Dans le cas du copolymère cellulose-styrène, et après l'extraction du polystyrène PS_G, l'extraction de la cellulose non greffée est impossible. De même le copolymère cellulose-styrène acétylé se prête mal à ce type d'extraction sélective, car le chloroforme et le chlorure de méthylène, solvants du triacétate de cellulose, sont également solvants du copolymère acétylé.

Nous avons donc été amené à utiliser une méthode par solubilisation et précipitation successives dans le mélange chloroforme-méthanol, suivant le schéma suivant : le copolymère acétylé est dissous dans le chloroforme, puis on ajoute une certaine quantité de méthanol, ce qui précipite une partie du copolymère. On recueille d'une part ce précipité, et d'autre part la partie solubilisée dans le mélange méthanol-chloroforme.

Le précipité est séché sous vide et la partie soluble évaporée, puis les deux parties sont dissoutes séparément dans du chloroforme. Ce cycle d'opérations est répété plusieurs fois.

Les fractions intermédiaires sont mélangées de façon habituelle, et les quantités de solvant utilisées ont été choisies pour conserver un certain équilibre entre les masses des différentes fractions.

Les cinq fractions 5_a à 5_e obtenue après quatre opérations, ont été étudiées par R.M.N., let les résultats des taux de greffage σ de ces fractions sont contenus dans le tableau III.

TABLEAU III

Fractions	5_a	5_b	5_c	5_d	5_e
σ °/₀	37,6	39	37,5	34,4	32,5

On peut noter que la constante relative de ce rapport indique une certaine homogénéité de l'échantillon C_{AE} utilisé.

Avant de discuter ces résultats il nous a semblé utile de démontrer que le processus utilisé de solubilisation ($CHCl_3$) et précipitation (méthanol) serait très efficace dans la séparation du copolymère étudié (C_{AE}) et du polystyrène, ou de ce copolymère et du triacétate de cellulose.

La séparation du polystyrène et du copolymère est très bonne par ce procédé : par exemple, en effectuant une précipitation et une solubilisation successives sur le produit C_A sans en séparer le polystyrène PS_A par extraction, on obtient une séparation excellente du polystyrène pur.

Quant à un mélange préparé par addition de triacétate de cellulose au copolymère, il a conduit au résultat suivant : 96 °/₀ de triacétate se retrouve dans la fraction soluble après

une seule précipitation, et cette fraction contient un taux négligeable de noyaux aromatiques.

Il est donc exclu que des chaînes de triacétate de cellulose non greffées soient présentes dans le copolymère C_{AE} obtenu.

Cela démontre que le copolymère est homogène et qu'il y a liaison chimique entre cellulose et polystyrène.

L'interprétation du spectre R.M.N. des deux dérivés cellulosiques étudiés conduit non seulement à certaines vérifications de conformation de la macromolécule, mais permet également deux applications intéressantes :

- le dosage du taux d'acétylation dans les acétates
- le dosage du taux de greffage des copolymères greffés de la cellulose.

PARTIE EXPERIMENTALE

1 - Spectres de R. M. N.

Les échantillons commerciaux d'acétate et de triacétate de cellulose ont été utilisés sans aucune purification ou séchage préalable.

Ce sont, pour l'acétate, un échantillon FLUKA n° 51.921, Eastman Kodak 39.8-3 et Prolabo, et pour le triacétate un échantillon fourni par Rhodiaceta.

A 60 MHz des spectres de R. M. N. ont été effectués sur VARIAN A. 60 et les résultats des déplacements chimiques sont donnés vers les champs faibles en ppm, par rapport au T. M. S. utilisé comme étalon interne.

L'analyseur multicanaux utilisé est un modèle SA 40 (400 canaux) (Intertechnique) ; l'adaptation sur le A. 60 étant la version expérimentale d'un appareil commercial. Le détail de l'appareillage est précisé par ailleurs [27].

A 100 MHz les spectres ont été effectués sur VARIAN HA.100. L'analyseur multicanaux est alors l'appareil VARIAN C-1024 (1 024 canaux).

2 - Hydrolyse de l'échantillon commercial (DS inférieurs = 2,4)

Elle est effectuée d'après [14].

On part de 30 g d'acétate de cellulose commercial Prolabo (DS = 2,4) que l'on met en suspension dans 150 g d'acide acétique et 54 g d'eau à 40°C. La dissolution se produit après 4 heures d'agitation. On ajoute alors 4 cm^3 d'acide chlorydrique concentré. Les temps d'hydrolyse sont comptés à partir de cet instant.

Au bout de 51 heures, on ajoute 20 cm^3 d'eau car le milieu devient trop visqueux : on évite ainsi toute précipitation. Des prélèvements de 10 cm^3 sont effectués en cours d'hydrolyse. L'acétate ainsi obtenu est précipité dans un large excès d'eau, neutralisé par le bicarbonate, lavé et filtré.

Temps de réaction	0 h	1 h	19 h	25 h	44 h
Dosage R.M.N.	2,4	2,17	1,5	1,4	0,9 solvant : D_2O
	solvant		pyridine		
Dosage chimique [2]	2,2	2,11	1,33	1,10	0,75
	2,22	2,07	1,28	1,12	0,76

3 - Acétylation de l'échantillon commercial : DS supérieur à 2,4

a) A partir de 1 g d'acétate commercial que l'on met en suspension dans un mélange de 25 cm^3 d'acide acétique et de 15 cm^3 de chlorure d'acétyle ; la réaction s'effectue à température ambiante pendant 48 heures.

Le produit obtenu est précipité dans l'eau, lavé à l'eau, à l'alcool et séché.

Dosage R.M.N. DS = 2,80

Dosage chimique DS = 2,86

b) Obtention du triacétate [15]

A partir de 11 g d'acétate commercial que l'on dissout dans un mélange de 225 cm^3 d'acide acétique et de 25 cm^3 d'anhydride acétique.

Agitation pendant une nuit à température ambiante. On ajoute alors 10 cm^3 d'acide acétique avec 2 cm^3 d'acide perchlorique à 65 °/₀.

La réaction s'effectue en 30 minutes. L'acétate en solution est alors précipité dans l'eau. On lave le produit à l'eau jusqu'à neutralisation des eaux de lavage, puis à l'alcool méthylique :

Dosage R.M.N. DS = 3

Dosage chimique DS = 3

4 - Préparation de l'acétyl-carbamate de cellulose [17]

On part de 1,190 g d'acétate de cellulose (DS = 2,4), séché à l'étuve à 110°C pendant une heure, et dissous dans 25 cm^3 de pyridine anhydre.

On ajoute 1 cm^3 de phényl isocyanate (à peu près trois fois la quantité théorique).

La réaction s'effectue à 100°C, avec agitation, pendant 70 heures.

Le milieu réactionnel est refroidi, puis le produit est précipité dans du méthanol.

Après lavage au méthanol et séchage sous vide, on récupère 1,424 g. Rendement : 82 °/₀ .

5 - Greffage styrène-cellulose : obtention du copolymère greffé (C_G)

La cellulose utilisée est un échantillon commercial de rayonne (*) ayant un DP égal à 255.

Un échantillon de rayonne (0,694 g) est gonflé dans l'eau, l'eau étant remplacée peu à peu par l'alcool, puis par le styrène. L'échantillon de cellulose en suspension dans le monomère est alors placé dans une pile piscine (**) assez loin du coeur, de manière à n'être accessible pratiquement que par du rayonnement γ . La dose d'irradiation est de 7.10^5 Reps/H pendant 5 heures, soit une dose totale de $3,5.10^6$ Reps.

Après cette opération, l'échantillon est placé dans un thermostat à 50°C pendant 48 heures. Pour éliminer le polystyrène non greffé formé à côté du polymère, on extrait l'échantillon dans un Soxhlet pendant 48 heures avec du benzène (solvant du polystyrène).

Après 48 heures, aucune extraction supplémentaire ne se produit : le polystyrène extrait est appelé PS_G. L'échantillon après avoir été séché sous vide, a un poids de 2,013 g (C_G, taux de greffe, 190 °/₀).

6 - Acétylation : obtention du copolymère acétylé (C_{AE})

On utilise le mélange benzène-acide acétique anhydre dans les protortions : 75 °/₀ et 25 °/₀ , l'acétylation étant catalysée par l'acide sulfurique concentré [23].

On prend 1,842 g de copolymère préparé de la manière indiquée ci-dessus, que l'on disperse en milieu acétique, la suspension étant portée à 40°C, pendant 18 heures.

L'acétate est précipité dans l'eau, lavé et séché sous vide ; on recueille 2,11 g de produit CA. Le degré de substitution des groupes OH calculé à partir de l'augmentation de poids est de 2,8.

Si l'on extrait en continu pendant 24 heures au benzène 1,957 g de copolymère acétylé, on obtient, après séchage sous vide, d'une part 1,240 g de copolymère insoluble dans le benzène (C_{AE}) et d'autre part, 0,717 g de polystyrène en solution dans le benzène (PS_A). Le polystyrène est identifié par son spectre infra-rouge et son spectre de résonance magnétique nucléaire. On peut noter que le polystyrène ainsi extrait correspond à 72 °/₀ du polystyrène contenu dans le copolymère avant acétylation et qu'il contient des impuretés provenant des unités glucose de la cellulose initiale.

7 - Fractionnement de C_{AE}

1,240 g de la fraction C_{AE} sont dissous dans 20 cm^3 de $CHCl_3$ puis précipité par 20 cm^3 de méthanol. Le précipité est recueilli par centrifugation, séché sous vide et pesé. La

---

* Rayonne viscose Compagnie Industrielle Textiles Artificiels, Grenoble.

** Pile MELUSINE, Centre d'Etudes Nucléaires, Grenoble.

solution est évaporée sous vide et pesée. Chaque fraction est alors dissoute séparément dans le chloroforme.

- Précipité fraction 2a : 289 g dissous dans 5 cm^3 de $CHCl_3$ précipité par 25 cm^3 de méthanol.
- Solution 2b : 877 mg dissous dans 20 cm^3 de $CHCl_3$ précipité par 40 cm^3 de méthanol.

Pour les autres précipitations, les quantités suivantes de solvants ont été utilisées :

- 3a	:	277 mg	5 cm^3	$CHCl_3$	20 cm^3 MeOH
- 3b	:	640 mg	15 cm^3	$CHCl_3$	20 cm^3 MeOH
- 3c	:	183 mg	15 cm^3	$CHCl_3$	10 cm^3 MeOH
- 4a	:	265 mg	8 cm^3	$CHCl_3$	10 cm^3 MeOH
- 4b	:	218 mg	5 cm^3	$CHCl_3$	8 cm^3 MeOH
- 4c	:	382 mg	40 cm^3	$CHCl_3$	15 cm^3 MeOH
- 4d	:	162 mg	5 cm^3	$CHCl_3$	5 cm^3 MeOH

On obtient ainsi les fractions :

- 5a : 93 mg - 5b : 276 mg - 5c : 470 mg
- 5d : 89 mg - 5e : 78 mg.

A chaque précipitation, on a ajouté une quantité de méthanol de manière à garder un certain équilibre en poids pour les fractions extrêmes.

BIBLIOGRAPHIE

[1] F.A. BOVEY, G.V.D. TIERS,
Fortsch. Hoch. Polymer. Forsch., 1963, 3, 1391.

[2] F.A. BOVEY, G.V.D. TIERS, G. FILIPOVICH
J. Polym. Sci., 1959, 38, 73.

[3] R.J. KERN, J.V. PUSTINGER
Nature, 1960, 185, 236.

[4] W.C. TINCHER
Makromol. Chem., 1965, 85, 46.

[5] K.C. RAMEY et N.D. FIELD
Polymer Letters, 1964, 461.

[6] M.P. KLEIN et C.W. BARTON Jr.
J. Chem. Phys., 1963, 192, 183.

[7] O. JARDETZKY
Nature, 1963, 192, 183.

[8] P. LASZLO, P. Von R. SCHLEYER
J. Amer. Chem. Soc., 1963, 85, 2017.

[9] H. FREIBOLIN, G. KEILICH, E. SIEFERT
Angew. Chem. Internat. Edit., 1969, 8 (10), 766.

[10] D. GAGNAIRE, M. VINCENDON
Bull. Soc. Chim., 1965, 472.

[11] D. GAGNAIRE, L. ODIER, M. VINCENDON
J. Polymer. Sci., Part C, 1969, n° 28, 27.

[12] O. EBERSTADT
"Ueber Acetylcellulose"
Heidelberg, 1909.

[13] Interlaboratory Study on determination of acetyl in cellulose acetate,
Anal. Chem., 1952, 24, 400.

[14] R.L. WHISTLER, M.L. WOLFROM
"Methods in Carbohydrate Chemistry", Vol. III,
Academic Press, N.Y., 1963, 198.

[15] R.L. WHISTLER, M.L. WOLFROM
"Methods in Carbohydrate Chemistry", Vol. III,
Academic Press, N.Y., 1963, 201.

[16] D. GAGNAIRE, D. ROBERT
Bull. Soc. Chim., 1968, 281.

[17] W.M. HEARON, G.D. HIATT, C.R. FORDYCE
J. Amer. Chem. Soc., 1943, 65, 829.

[18] R.E. GIEGG, Z.I. KERTESZ
J. Polym. Sci., 1957, 26, 289.

[19] R.J. ABRAHAM, D.H. WHIFFEN
Trans. Farad. Soc., 1958, 54, 1291.

[20] J. CAMBRISSON, J. UEBERFELD
Compt. Rend., 1954, 238, 1397.

[21] A. CHAPIRO, V. STANNETT
Intern. J. Appl. Rad. Isotopes, 1961, 53, 87.

[22] Kh. USMANOV, B.I. AIKNO DZHAEV, V.O. AZIZOV
J. Polym. Sci., 1961, 53, 87.

[23] Y. KOBAYASHI
J. Polym. Sci., 1951, 51, 359.

[24] D. GAGNAIRE, M. VINCENDON
Bull. Soc. Chim., 1966, 204.

[25] M. VINCENDON
Peintures, Pigments, Vernis, 1967, 43 (3), 164.

[26] Y. HACHIHAMA, S. TAKAMAKU
Techn. Rep. Osaka Univ., 1961, 11, 485.

[27] D. GAGNAIRE, V. SPIVAK
Nucl. Instrument and Meth., 1966, 44, 81.

CHAPITRE II

DETERMINATION PAR R.M.N. DE LA POSITION DES SUBSTITUANTS DANS LES DERIVES CELLULOSIQUES

1 - Etude des méthylcelluloses

Les études faites sur les méthylcelluloses ont montré les difficultés qu'il y avait à obtenir des produits à degré de substitution élevé. L'étude de la substitution de dérivés cellulosiques par R.M.N. nécessite l'obtention du dérivé trisubstitué.

Les techniques décrites par PURDIE et IRVINE [1], HAWORTH [2], ainsi que les méthodes dérivées ont été remplacées par la méthode décrite par HAKAMORI [3] qui consiste à faire réagir le carbanion méthylsulfinyl sur les polysaccharides, cette réaction facilitant la synthèse des éthers méthyliques à partir de l'iodure de méthyle suivant le schéma :

$$R\text{-}OH + CH_3\text{-}SO\text{-}CH_2^- \longrightarrow RO^- Na^+ + CH_3\text{-}SO\text{-}CH_3$$

$$NO^- Na^+ + CH_3I \longrightarrow ROCH_3 + NaI$$

Cette méthode a été appliquée à la méthylation des polysaccharides et la comparaison avec les autres méthodes montre que l'on obtient des produits plus méthylés et moins dégradés en une seule étape [4, 5, 6, 7].

Nous avons synthétisé la triméthylcellulose en utilisant la méthode de HAKAMORI simplifiée, et identifié le produit obtenu par R.M.N.

Pour identifier le degré de substitution de chacune des trois positions du cycle glucose, après méthylation partielle, nous avons utilisé la méthode appliquée par GOODLETT [8, 9] sur les acétates de cellulose. Cette méthode consiste, à partir d'un échantillon partiellement méthylé par CH_3I statistiquement sur les trois fonctions OH, à perméthyler par CD_3I de manière à obtenir la triméthylcellulose. L'intensité de chaque pic méthyle donne le degré de substitution de chaque position. Cette méthode a également été employée pour des molécules simples possédant plusieurs fonctions réactives, pour déterminer la substitution relative de chaque fonction dans le cas d'un acétate de glucose partiellement acétylé [10] de méthylglucoses [11a, 11b] et de méthyl-galactoses [12].

- Résultats et discussion

La caractérisation des méthylcelluloses a toujours été faite jusqu'ici par des méthodes chimiques : dosage du taux de méthoxyle, dégradation en méthylglucose et analyse du mélange de sucres. Ces méthodes ont l'inconvénient de ne pas représenter directement le polymère étudié, mais d'en donner une image qui peut être modifiée par les réactions chimiques que le polymère a subies. Dans le cas de l'hydrolyse par exemple, la réaction n'est pas quantitative, la partie non analysée peut représenter en fait un fractionnement.

Nous avons appliqué à l'étude des méthylcelluloses de degré de substitution élevé deux techniques spectroscopiques, l'IR et la R.M.N., permettant l'analyse directe de ces polymères.

Le Tableau 1 indique le degré de substitution moyen des différents échantillons après chaque méthylation ainsi que leur solvant.

TABLEAU 1

N° de l'échantillon	Nombre de méthylations	Degré de substitution moyen	°/₀ de OCH_3	Rendement	Solvant
1	1 ($\frac{1}{2}$ mole de CH_3I par OH libre)	0,8	18 °/₀	84,5	sans
2	1 (1 mole de CH_3I par OH libre)	2,3		88,5	$CHCl_3$
3	2	2,75	42 °/₀	80	-
4	3	3			-
5	4	3	43,25	78,8	-

Nous voyons que la méthode de méthylation utilisée donne en une seule méthylation un degré de substitution de 2,3 et après trois méthylations la triméthylcellulose. Le degré de polymérisation de l'échantillon n° V déterminé par diffusion de la lumière dans le chloroforme est de 1 000, ce qui montre que la méthode est relativement peu dégradante.

La figure 1 montre le spectre I.R. des différents échantillons effectués sous forme de film, pour les échantillons solubles dans $CHCl_3$ et dans KBr en poudre sous forme de pastille pour la cellulose et l'échantillon n° 1 .

Sur ces spectres nous voyons que la bande OH décroît régulièrement avec le nombre de méthylations, et qu'elle ne disparaît entièrement que pour quatre méthylations. Après

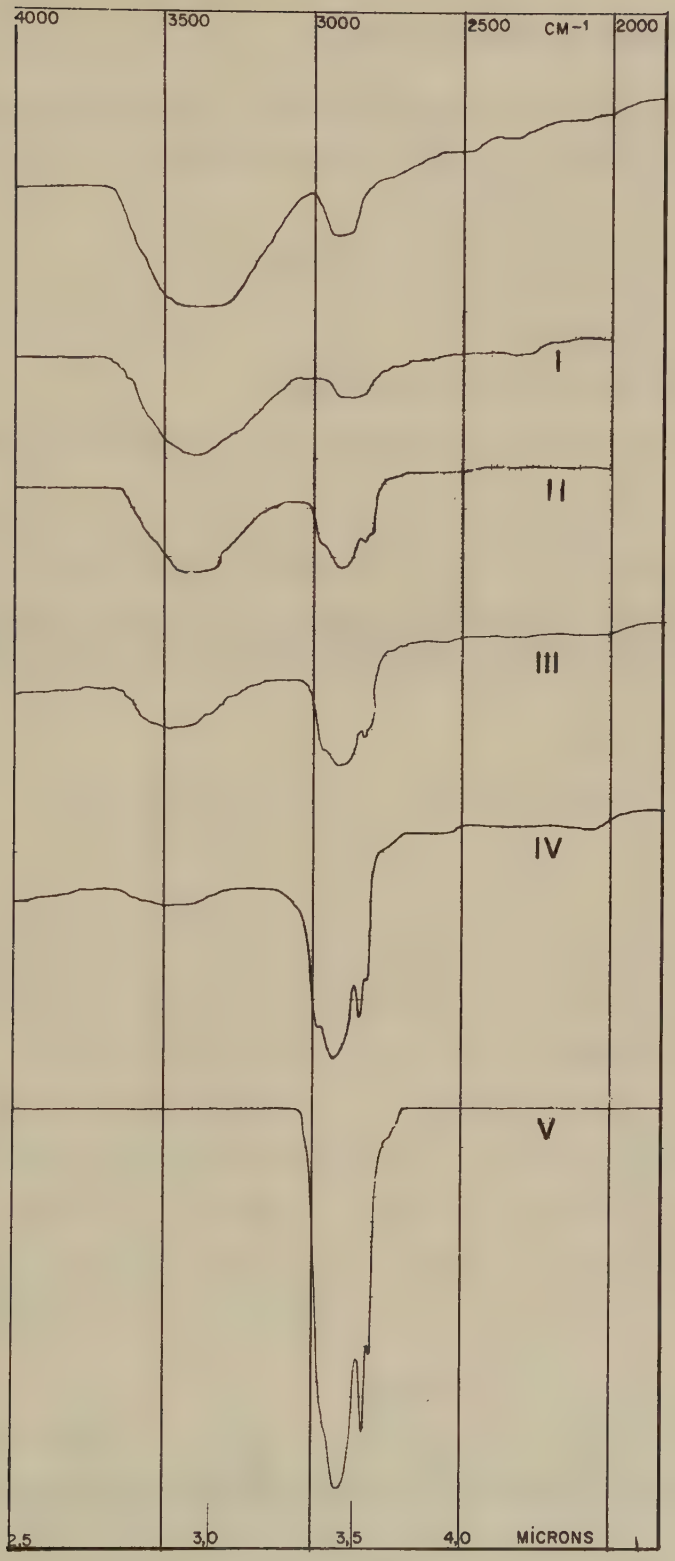


Figure 1 - Spectres infrarouges des méthyles celluloses.

trois méthylations, bien que le degré de substitution moyen trouvé soit de trois, il subsiste encore des fonctions OH non méthylées.

- Spectre de R. M. N. de la triméthylcellulose

Les spectres ont été effectués à 100 MHz, en additionnant une trentaine de passages.

Le spectre donné par la figure 2 se présente de la manière suivante, en donnant les déplacements chimiques par rapport au TMS :

- 1 doublet à 4, 3 ppm correspondant à 1 proton (H_1)
- 2 pics méthylés à 3, 52 et 3.48 ppm
- 1 pic méthyle à 3, 33 ppm
- 1 triplet à 2, 90 ppm correspondant à 1 proton.

Sous les pics méthyles des groupes OCH_3 se trouvent donc cinq protons du cycle glucose.

La figure 3 montre le spectre de la tri-méthyl (d_9)-cellulose obtenu dans les mêmes conditions de méthylation par l'iodure de méthyle deutérié CD_3I. Ce spectre montre la disparition des trois pics méthyles laissant apparaître deux massifs de protons situés à 3, 65 ppm correspondant à trois protons et un massif entre 3, 4 et 3, 05 ppm correspondant à deux protons.

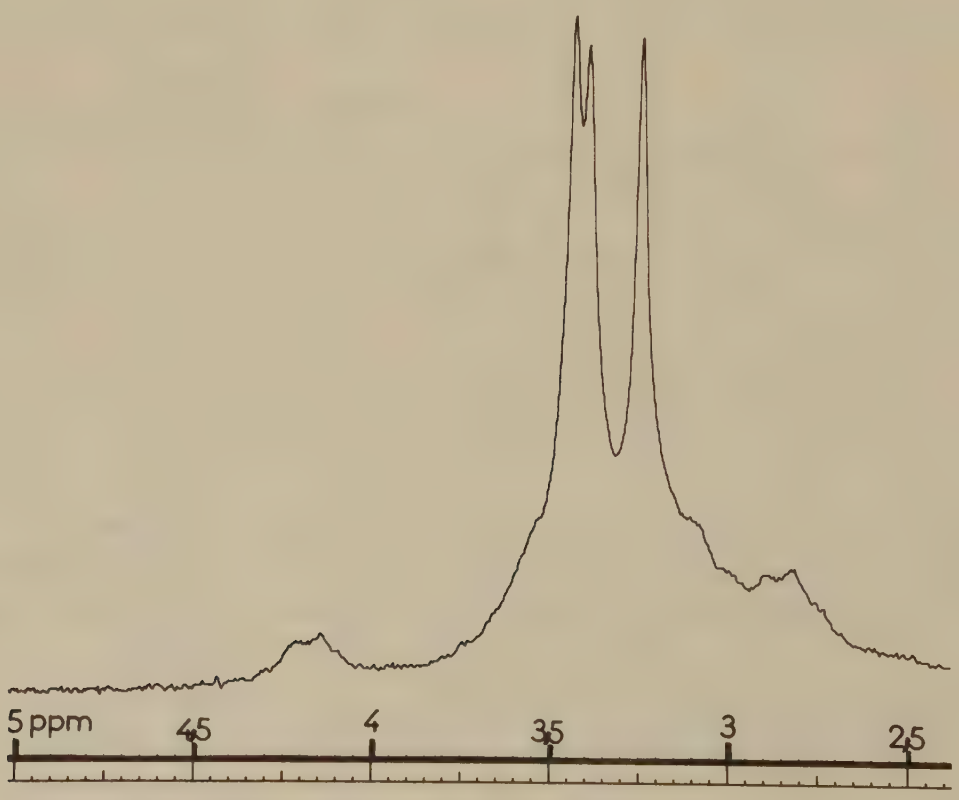


Figure 2 - Spectre à 100 MHz de la triméthyl cellulose (30 passages)

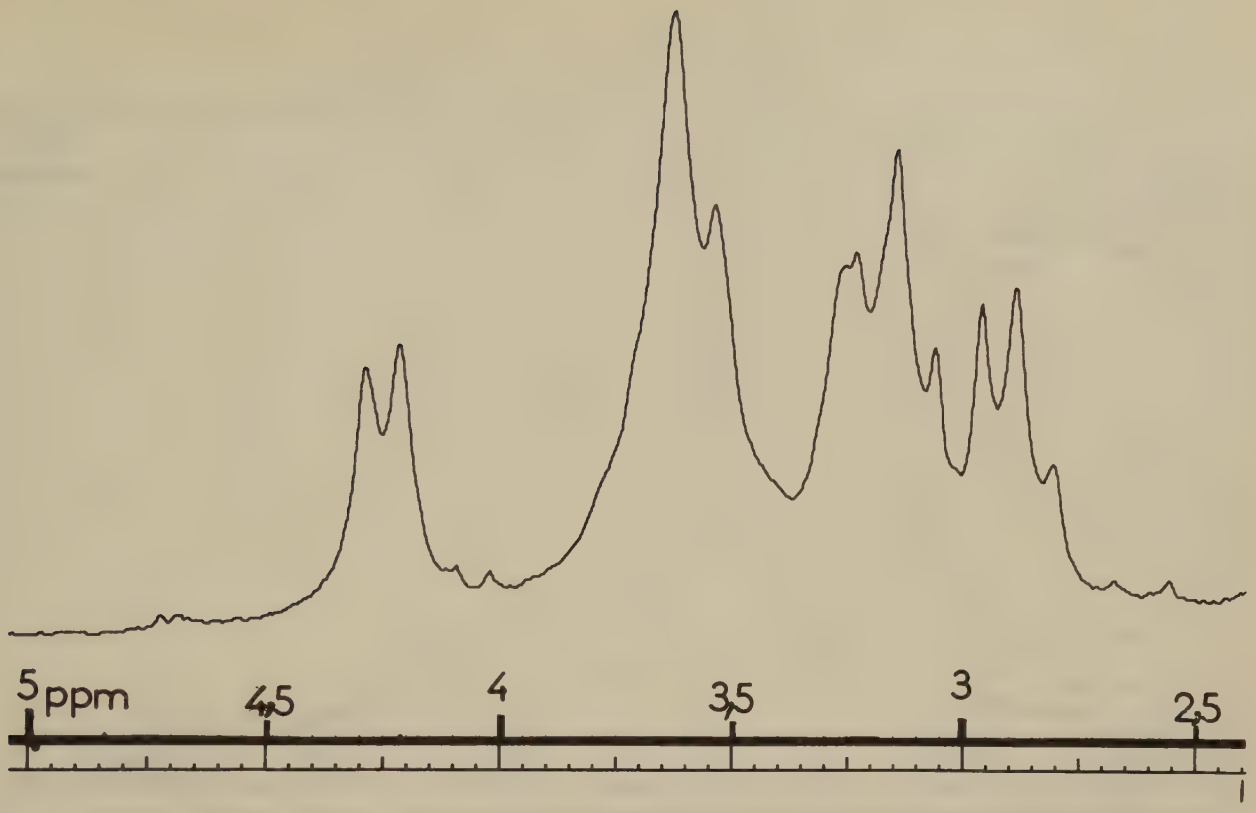


Figure 3 - Spectre de la triméthyl-d_9-cellulose à 100 MHz (30 passages)

Le spectre du même produit effectué à 250 MHz en un seul passage, sur l'appareil THOMSON-CSF TSN-250 est donné par la figure 4. Bien que le spectre ne soit pas sorti sur une échelle agrandie, les différents pics sont plus séparés, l'échelle étant étalée 2,5 fois par rapport à 100 MHz, ceci permet de donner l'attribution suivante aux différents protons :

- à 4,3 ppm le doublet du proton H_1 (J = 8 Hz), le proton H_1 étant le seul proton ayant en α un atome d'oxygène hétérocyclique et un atome d'oxygène glycosidique.

Par irradiation de ce protons à 4,3 ppm nous avons observé que le triplet résonnant à 2,90 ppm se rassemblait. L'observation de ce phénomène, bien qu'il soit net que le signal soit modifié, ne permet pas d'observer un doublet, car sur une solution diluée de polymère la structure n'est jamais nette.

- Le triplet à 2,90 ppm est donc le proton H_2 (J = 8 Hz).

- Le triplet situé à 3,17 ppm (J = 8 Hz) ne peut être que le proton H_3 identique à H_2 puisqu'il porte en α un groupe OCH_3, le seul autre triplet possible étant H_4 qui lui est lié à un atome d'oxygène de la liaison glycosidique, qui a une influence plus grande qu'un groupe éther.

- Sur cette base on peut attribuer aux deux protons H_6 et H'_6 les pics à 3,25 et 3,55 ppm.

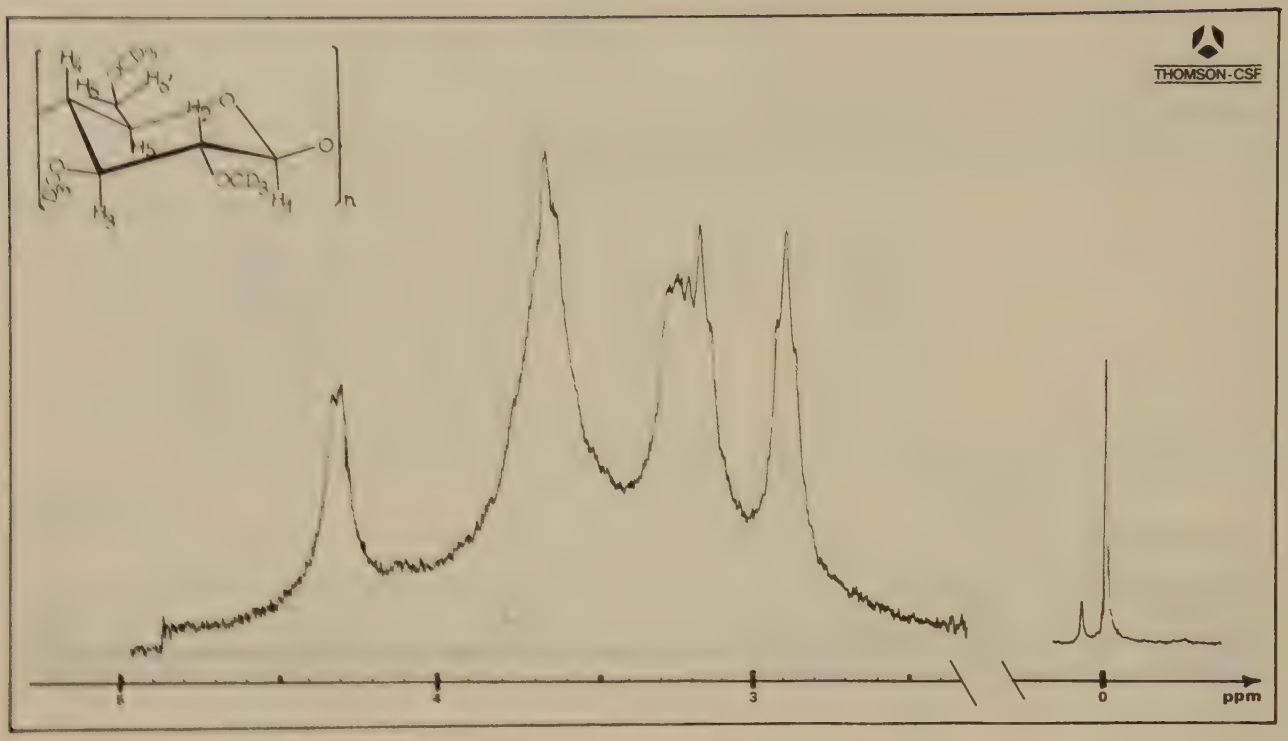


Figure 4 - Spectre de la triméthyl-d_9-cellulose à 250 MHz.

- Dans le massif situé à 3,65 ppm se trouvent les deux protons H_4 et H_5 trouvant en α d'un atome d'oxygène glycosidique et hétérocyclique.

D'après cette attribution nous voyons que contrairement aux acétates un groupe éther secondaire déplace moins le proton en α qu'un groupe éther primaire et que l'influence d'un groupe éther est moins forte que celle des atomes d'oxygène glycosidiques ou hétérocycliques. Ceci a été vérifié sur les spectres des α et β tétra-O-méthyl méthyl-D-glucopyranosides, ou les protons H_2 et H_3 sont les moins déplacés.

La soustraction de ce spectre au spectre de la triméthylcellulose normale permet d'obtenir par différence le spectre des trois méthyles et l'intensité relative entre le groupe des deux méthyles à 3,52 à 3,48 ppm et le pic isolé à 3,33 ppm.

- Identification des trois substituants méthyles

L'identification du pic méthyle en position 6 a été faite en partant de la trityl-6-cellulose [18], méthylée en positions 2 et 3 par l'iodure de méthyle, puis détritylation de la position 6 et perméthylation à l'iodure de méthyle deutérié. Le spectre obtenu figure 5 montre

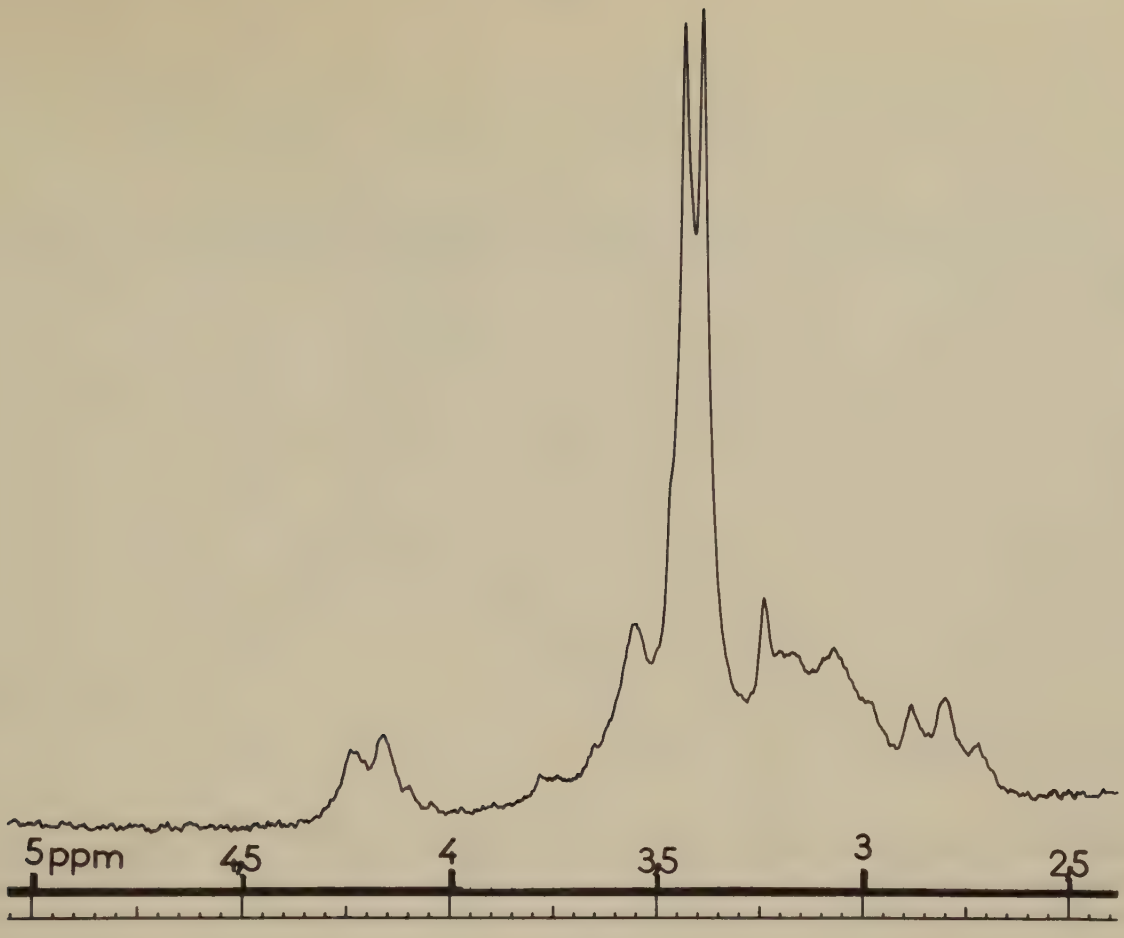


Figure 5 - Spectre de la diméthyl 2-3 méthyl-d_3- 6 cellulose à 100 MHz (30 passages).

que le pic méthyle à 3,33 ppm a disparu, indiquant ainsi que le pic méthyle légèrement moins déplacé est celui dû au groupe méthoxy en position 6.

Les deux méthyles à 3,52 et 3,48 ppm sont donc dus aux groupes méthoxy en positions 2 et 3. Pour choisir entre ces deux positions, nous avons préparé la méthylcellulose suivant la méthode proposée par WOLFROM [14] réputée être spécifique de la position 2 avec CD_3I. Ce produit a été perméthylé par CH_3I, on obtient ainsi un produit dont le spectre est donné par la figure 6.

Ce spectre montre qu'aucun des trois méthyles n'a disparu entièrement, l'intensité des deux pics à 3,52 et 3,48 ppm a plus diminué que celle du pic méthyle en 6. Ceci montre que la méthode de méthylation donnée par WOLFROM ne distingue pas la position 2 de la position 3, mais qu'elle est légèrement plus spécifique de la fonction alcool secondaire.

Un dosage effectué en prenant le rapport des hauteurs de chaque pic dans l'échantillon par rapport au pic correspondant de la triméthylcellulose montre que la distribution des groupes OCD_3 est de 35 °/₀ sur le pic à 3,52 , 37 °/₀ sur le pic à 3,48 et 28 °/₀ sur le pic 3,33 ppm (position 6).

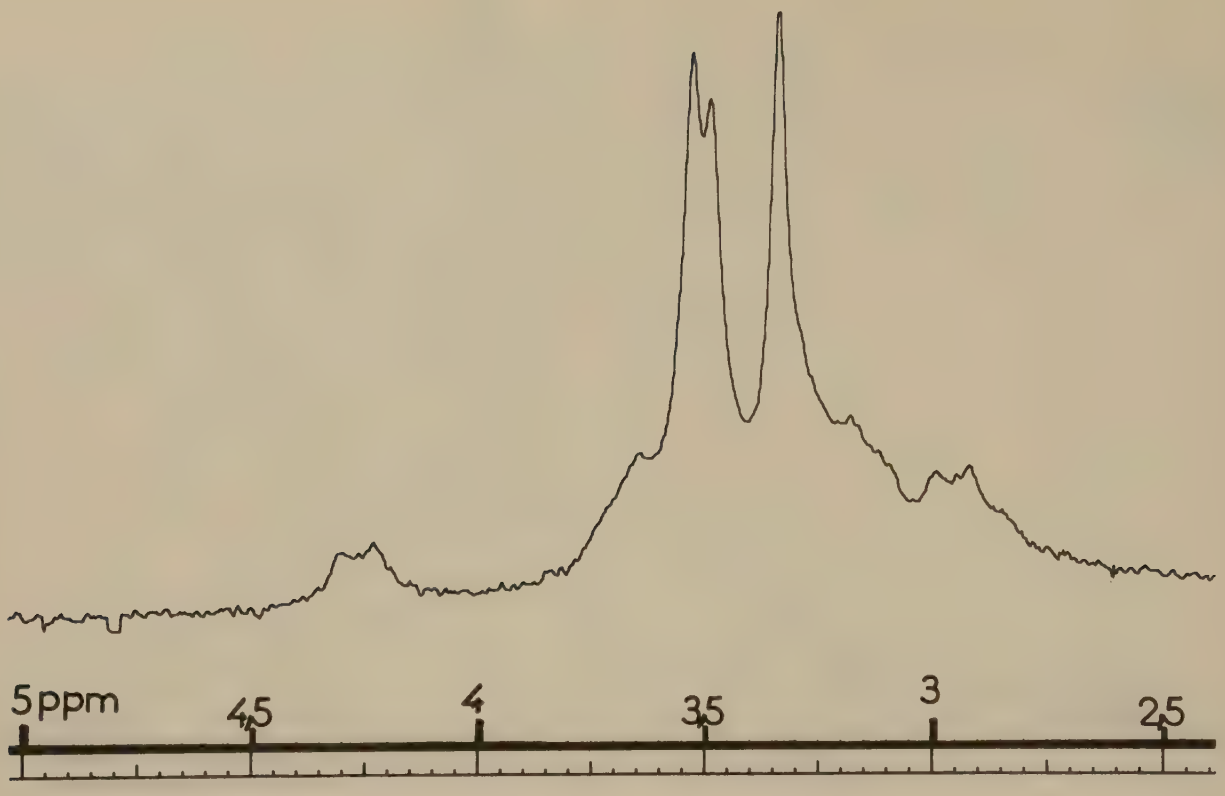


Figure 6 - Spectre de la triméthyl cellulose à 100 MHz (Méthode de WOLFROM).

Cependant, de nombreuses réactions ont montré que le OH en position 2 était plus réactif que celui de la position 3 [15]. Nous avons tenté d'utiliser cette propriété pour différencier les méthyles en 2 et 3. Nous avons pris l'échantillon n° 1 (DS = 0,8) obtenu après une méthylation avec la moitié de la quantité stoechiométrique de CH_3I nécessaire à chaque fonction OH. Après perméthylation par CD_3I de ce produit, de manière à obtenir la triméthylcellulose, on obtient un spectre ayant les trois pics d'intensité pratiquement égale (figure 7). Ceci montre que dans les conditions de méthylation utilisées, les trois fonctions OH sont également réactives.

Nous pouvons cependant faire des hypothèses en ce qui concerne l'attribution de ces deux groupes méthyles à 3,52 et 3,48 ppm. En effet, si l'on considère la position des groupes méthyles dans le tétra-O-méthyl 2-3-4-6-méthyl β D glucopyranoside qui est un excellent modèle de triméthyl-cellulose, les groupes OCH_3 en positions 1 et 4 étant situés de manière identique aux unités glucose en cadrant l'unité considérée. Dans un tel corps, quel que soit le solvant, benzène ou chloroforme, on retrouve une distribution identique à celle de la cellulose, en faisant abstraction des méthyles en 1 et 4, le groupe méthyle en position 6 est nettement moins déplacé que les deux méthyles en positions 2 et 3, le méthyle en 3 étant le plus déplacé [11a]. On peut donc attribuer le pic à 3,52 ppm ou méthyle en 3 et le pic à 3,48 ppm ou méthyle en 2.

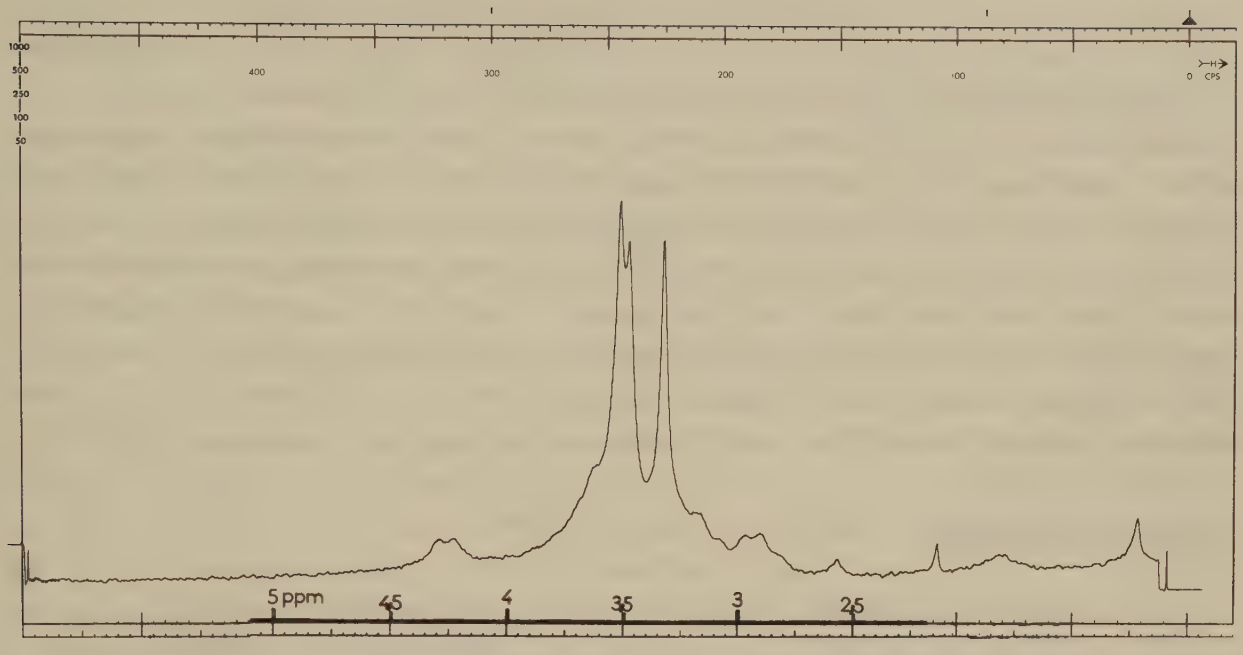


Figure 7 - Spectre de la triméthyl cellulose (DS = 2,3) à 100 MHz (30 passages).

Cette technique peut être généralisée à l'étude des méthylcelluloses de faible degré de substitution. Après perméthylation à CD_3I, on obtient le spectre de la triméthylcellulose et la comparaison des intensités des pics méthyles permet un dosage qualitatif du degré de substitution de chaque position. Il faut cependant tenir compte de l'intensité des protons du cycle glucose se trouvant dans les pics des méthyles.

La précision de ce dosage est de l'ordre de 10 °/₀ si l'on se contente de mesurer la surface des pics OCH_3. Cette précision pourrait cependant être améliorée en introduisant une méthode de traitement de l'information. Ceci n'a pas été jugé utile en l'absence de l'identification des méthyles en positions 2 et 3.

- Comparaison des différentes méthodes de dosage du taux de méthoxyles

Par intégration du proton 1 à 4,3 ppm et du reste du spectre, on peut obtenir une une valeur du degré de substitution de la méthylcellulose. Cette détermination ne peut se faire qu'avec un spectromètre à haut champ, de manière à ce que le proton 1 soit bien séparé du reste du spectre. A 100 MHz la précision du dosage est de l'ordre de 10 °/₀ .

En IR le DS est obtenu en comparant les rapports des intensités des vibrations ν_{OH} et ν_{C-H} de chaque échantillon à celui de la cellulose d'une part, et de l'échantillon n° V (DS = 3) d'autre part.

Le degré de substitution donné par la méthode chimique (dosage du taux de méthoxyles par la méthode de Zeisel) était la seule méthode employée jusqu'ici. Cependant, le résultat du dosage de l'échantillon n° V ne montrant plus de vibration OH et IR, présente un taux de méthoxyle moyen de 43,25 °/₀ correspondant à un DS = 2,8 bien que la méthode de dosage ait été vérifiée et donne entièrement satisfaction sur des substances témoins. Il est possible que l'attaque hétérogène de la cellulose ne libère pas quantitativement tout l'iodure de méthyle. La méthode par voie chimique semble toujours donner un résultat par défaut, au moins pour les taux de substitution élevés. Nous avons effectué une vérification du taux de méthylation de cet échantillon, en dégradant la triméthylcellulose en glucose, par hydrolyse à l'acide sulfurique. Le triméthyl-2-3-6 glucose ainsi obtenu est acétylé sur les positions 1 et 4. Le spectre de R.M.N. du produit brut montre que l'on a le diacétyl 1-4 tri-O-méthyl 2-3-6-glucopyranose en mélange α et β.

- Acétates de cellulose

Nous avons vu dans le chapitre précédent, que le triacétate de cellulose donne trois pics correspondant aux trois groupes acétates en positions 2, 3 et 6 à 2,17 , 2,05 et 1,99 ppm. Le dosage du taux de substitution global est obtenu par intégration des groupes acétates par rapport aux protons du cycle il est intéressant de savoir comme dans le cas de la triméthylcellulose, si l'identification des trois pics est possible et dans ce cas si l'on peut obtenir un taux de substitution de la fonction primaire [16] dont la nature est différente des positions 2 et 3, qui sont des fonctions secondaires. Par contre, il n'existe aucune méthode qui permette de choisir entre les deux positions secondaires.

Il est possible en principe de donner le taux de substitution de chaque position d'un acétate quelconque, en peracéthylant cet acétate par un réactif deutérié et en mesurant en R.M.N. l'intensité relative de chaque pic. L'attribution des trois pics a été faite par GOODLETT [8] et vérifiée par nous en ce qui concerne la position 6 [17].

La comparaison entre les spectres des acétates de cellulose et des méthylcelluloses se traduit par ces deux remarques :

- Le déplacement chimiques des groupes acétates est différent de celui des protons du cycle, il n'y a donc pas superposition dans le cas des acétates, ce qui est un facteur favorable.
- La mobilité des groupes acétates est beaucoup plus grande que celles des groupes méthoxy, ce qui peut introduire des erreurs dues à la migration au cours des différentes réactions. Comme dans le cas des méthylcelluloses, on peut appliquer la tritylation, réaction spécifique de la position 6. Pour cela nous sommes partis d'un acétate de cellulose commercial Prolabo (DS = 2,4) dont la quantité de groupe OH est approximativement identique sur les trois positions. Cet acétate a été tritylé de manière à substituer les groupes OH en position 6 [18] par le chlorure de triphényl méthyle dans la pyridine. On obtient alors un corps où la position 6

est entièrement substituée, soit par des groupes acétates, soit par des groupes trityles. Ce composé est alors péracétylé par le mélange anhydride acétique-pyridine à froid pendant une semaine. On obtient donc un acétate de cellulose ayant en moyenne 0,3 unité trityle en position 6, le spectre R.M.N. de ce produit intermédiaire permet le dosage par les protons aromatiques du groupe trityle.

Ce composé est alors détritylé suivant la méthode de LEIGH [19] par l'acide bromhydrique dans l'acide acétique. L'auteur a montré que cette méthode de détritylation n'introduisait pas de migration de groupes acétates. Le composé obtenu est un acétate de cellulose ayant des groupes OH uniquement en position 6. Cet acétate est peracétylé dans le mélange anhydride acétique-d_6-pyridine à froid pendant une semaine. Ce réactif d'acétylation ne provoque pas de migration de groupes acétates.

Le produit obtenu est un triacétate de cellulose ayant des groupes $COCD_3$ en position 6, le pic correspondant sur le spectre R.M.N. devant être plus faible que les deux pics des acétates 2 et 3. Le spectre R.M.N. de ce produit à 100 MHz, est donné par la figure 8 et l'agrandissement de la région intéressante est donné sur la même figure. On voit sur ce spectre que le pic à 2,17 ppm, qui dans le triacétate normal a une intensité égale à celle du pic à 2,05, a ici une intensité plus faible, il s'agit donc du groupe acétate en 6.

Le choix entre les positions 2 et 3 a été fait par GOODLET sur des critères de réactivité relative de ces deux positions.

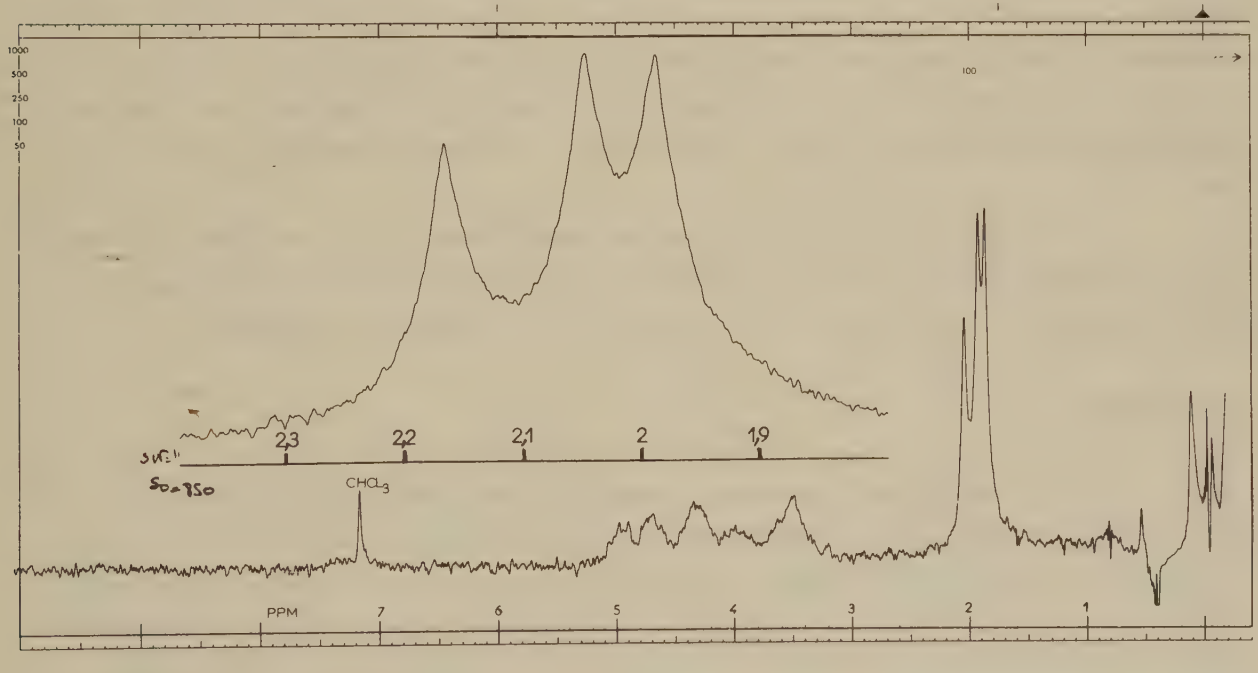


Figure 8 - Spectre du triacétate de cellulose-6-$COCD_3$ à 100 MHz.

PURVES et GARDNER [15] ont montré que la réactivité de la position 2 était 20 fois plus grande que celle de la position 3 vis à vis du chlorure de l'acide p-toluène sulfonique. En faisant donc réagir pendant un temps limité la cellulose, ou un acétate faiblement substitué, sur le chlorure d'acétyle GOODLETT montre qu'après peracétylation au chlorure d'acétyle-d_3 c'est le pic à 2,05 ppm qui est le plus intense et qui correspond donc au groupe acétate en 2. Bien qu'il y ait une forte présomption pour cette attribution, on ne doit pas oublier que la réactivité relative des positions 2 et 3 est très fortement variable suivant le réactif et suivant les conditions de réaction. Ce qui est valable pour le chlorure de l'acide p-toluène sulfonique, ne l'est pas forcément pour le chlorure d'acétyle. D'autre part GOODLETT utilise le chlorure d'acétyle-d_3 comme agent de peracétylation, cet agent d'acétylation peut introduire des migrations de groupes acétates, car on opère en milieu acide. Le fait que les trois pics acétates soient très voisins, et même se superposent pour les groupes 2 et 3 interdit d'effectuer un dosage du taux de substitution relatif par intégration. On peut comparer pour chacun des pics le produit de la hauteur par la largeur à mi-hauteur. On obtient ainsi un dosage avec une précision de l'ordre de 10 °/₀.

Nous avons essayé par le calcul de déterminer la contribution de chacun des pics à la courbe expérimentale, en prenant pour chacun de ces pics une forme de raie du type Lorentz avec une largeur de raie variable.

En faisant varier d'une part les largeurs de raies, et d'autre part l'exposant de Lorentz on arrive au résultat suivant :

- Si l'on prend pour le triacétate l'intensité de chaque pic égale à 1, le programme converge vers une solution dont la traduction graphique ne se superpose pas exactement au spectre expérimental.
- Si l'on fait varier l'intensité des raies en même temps que les autres facteurs, on converge vers une solution dont la traduction graphique donne le spectre expérimental, mais alors on obtient une intensité du pic à 1,99 ppm nettement plus faible que l'intensité des deux autres pics.

En fait cette méthode semble dépassée actuellement par la possibilité d'utilisation des spectromètres à haut champ (220 ou 250 MHz) avec lesquels les trois pics acétates sont entièrement séparés et ou l'on peut directement effectuer le dosage par intégration.

- Conclusion

L'introduction de la méthode de méthylation proposée par HAKAMORI permet d'envisager la chimie des dérivés méthylés de la cellulose, à taux de substitution élevés, sous un aspect plus quantitatif. En particulier, il devient possible d'avoir une idée de la position de substitution sur le cycle glucose, de méthylcelluloses faiblement substituées par méthylation à l'iodure de méthyle deutérié et comparaison des hauteurs des pics méthyles. Cette méthode appliquée à un échantillon faiblement substitué (DS = 0,8) a permis de montrer que la méthode de méthylation utilisée permet une méthylation statistiquement homogène sur les trois positions du cycle glucose.

Dans le cas des acétates de cellulose, si l'on évite les phénomènes de migration, lors de la peracétylation, le problème de la détermination du taux de substitution global est beaucoup plus simple. En ce qui concerne le taux de substitution relatif des trois positions, l'approximation qui consiste à mesurer la hauteur et la largeur à mi-hauteur donne une précision de l'ordre de 10 °/₀. La généralisation de l'emploi de la R.M.N. à haut champ permet dans le cas des acétates de donner une mesure précise du taux de substituion relatif de chaque position.

Dans le cas des méthylcelluloses, comme dans le cas des acétates, l'absence de réaction spécifique de la position 2 ou de la position 3 ne permet pas d'identifier la raie de résonance de ces deux substituants avec certitude.

En résumé, la R.M.N. permettant de différencier les substituants des positions 2, 3 et 6 sur la cellulose, permet un dosage rapide de ces différentes positions, mais la précision ne dépasse pas 10 °/₀. Il faut signaler que ceci est valable pour d'autres polysaccharides tel que l'amylose et les cyclodextrines [19].

PARTIE EXPERIMENTALE

1 - Synthèse des méthylcelluloses selon [1] et [3]

Nous avons toujours opéré avec 2 g de cellulose (linters de coton Karl-Scheicher-Schül n° 124). Le DP de nitrocellulose synthétisé à partir de ces linters, obtenu par viscosité dans l'acétone est de 1 500.

La cellulose est séchée sous vide à 50° pendant une nuit, puis mise en suspension dans du DMSO séché sur tamis moléculaire pendant 2 heures en portant la suspension à 50°C sous atmosphère d'azote. Après refroidissement, on ajoute goutte à goutte à la suspension de cellulose une solution de NaH dans le DMSO. La quantité de NaH est calculée de manière à avoir un ion méthyl-sulfynyl par OH libre (1,8 g de NaH à 50 °/$_o$ dans l'huile pour 2 g de cellulose). On laisse à l'agitation pendant 12 heures à température ambiante. On ajoute l'iodure de méthyle (2,5 cm^3 pour 2 g de cellulose), à raison de 1 mole par OH libre, goutte à goutte, dans le mélange réactionnel conservé dans la glace. On laisse à l'agitation pendant 4 heures.

Pour effectuer une deuxième méthylation, nous avons évaporé sous vide l'iodure n'ayant pas régi, puis répété les mêmes opérations en opérant à partir de l'addition de la cellulose d'hydrure.

Les méthylcelluloses sont obtenues par précipitation du mélange réactionnel dans six fois son volume d'eau. Le précipité est lavé à l'eau, à l'alcool, puis à l'éther. Il est ensuite séché sous vide.

Les produits solubles dans le chloroforme sont purifiés par dissolution dans $CHCl_3$ et reprécipitation dans le méthanol.

Lorsque la méthylcellulose est très dégradée, elle ne précipite pas dans l'eau. Le produit est alors isolé en ajoutant 200 cm^3 de $CHCl_3$ au milieu réactionnel, et après filtration on élimine le DMSO par extraction à l'eau. La solution de chloroforme est ensuite séchée sur Na_2SO_4, puis évaporée.

2 - Obtention de latrideuterio-méthyl-6 diméthyl 2-3 cellulose

Ce produit est obtenu à partir de la trityl-6 cellulose synthétisée suivant la méthode donnée par W. GREEN [12]. La trityl-6 cellulose (2 g) est traitée suivant la méthode générale par CH_3I (2 méthylations).

La détritylation est effectuée dans 100 cm^3 de méthanol contenant 1 cm^3 de HCl concentré pendant 16 heures. On obtient 0,6 g de 2-3 diméthylcellulose. Le produit est alors traité par CD_3I (deux méthylations). On obtient ainsi 0,28 g de cellulose perméthylée.

3 - Obtention de trideuterio-méthyl-2-diméthyl 3-6 cellulose

La cellulose est traitée suivant la méthode indiquée par WOLFROM [12].

A partir de 5 g de linters de coton, on obtient 4,9 g de cellulosate qui, traité par CD_3I à 100°C, donne 5,14 g de trideuterio méthyl-2-cellulose. Le produit ainsi obtenu (3,92 g) est ensuite perméthylé (trois méthylations) par la méthode générale avec CH_3I, ce qui donne 2,8 g de triméthylcellulose.

4 - Trideuterio-méthyl-2-3-6-cellulose

Ce produit a été obtenu après quatre méthylations par CD_3I.

5 - Hydrolyse des méthycelluloses

La méthylcellulose est placée dans l'acide sulfurique concentré (d = 1,84) jusqu'à dissolution complète. La solution est alors diluée à 8 °/₀ de H_2SO_4 et portée à ébullition pendant quatre heures. La solution obtenue est alors passée sur résine Amberlite IR-45-OH pour éliminer l'acide. Les sucres sont isolés par évaporation sous vide de la solution aqueuse.

6 - Acétylation des méthyl-glucose

Le mélange de méthyl-glucose obtenu par hydrolyse est traité par le mélange anhydride acétique-pyridine pendant seize heures à température ambiante. L'anhydride acétique est détruit par l'eau, le produit est alors extrait au chloroforme. La solution chloroformique est lavée à l'acide sulfurique et séchée sur sulfate de sodium.

7 - Tritylation de l'acétate de cellulose

4,4 g d'acétate Prolabo séché sous vide à 50°C pendant 4 heures sont dissous dans 25 cm^3 de pyridine anhydre (bidistillée sur P_2O_5) en chauffant dans un bain d'huile à 70°C.

On ajoute alors 60 g de chlorure de triphényl-méthyle et on laisse à l'agitation pendant 24 heures.

La solution refroidie est diluée par 10 cm^3 d'acétone puis précipité dans 250 cm^3 d'alcool éthylique. Le précipité est lavé abondamment à l'alcool puis séché sous vide. On obtient 3,9 g de produit.

8 - Peracétylation dans le mélange anhydride acétique-pyridine

3,3 g de produit séchés préalablement sous vide et chauffant à 50°C sont dissous dans 10 cm^3 de pyridine et 3 cm^3 d'anhydride acétique. La solution est laissée à l'agitation pendant une semaine à froid. La solution est d'abord diluée par un peu d'acétone, puis précipité dans un excès d'alcool. Le précipité est lavé puis séché.

9 - Détritylation de l'acétate de cellulose tritylé [19]

On dissout 1,05 g de produit dans 10 cm^3 d'acide acétique anhydre (distillé sur Cr_2O_3). On ajoute 1 cm^3 de solution d'acide acétique saturée de HBr gazeux. Le produit passe immédiatement en solution. La solution est précipitée dans 200 ml d'alcool éthylique, le précipité est lavé à l'alcool puis séché, on récupère 0,32 g de produit.

10 - Peracétylation par l'anhydride acétique d_6 - dans la pyridine

Elle se fait comme la peracétylation précédente en ne mettant que 6 fois la quantité théorique nécessaire à l'acétylation.

11 - Spectres IR et R.M.N.

Les spectres IR ont été effectués sous forme de film pour les échantillons solubles dans $CHCl_3$ et dans la poudre de KBr pour les autres échantillons sur un appareil PERKIN ELMER 137.

Les spectres de R.M.N. à 100 MHz sont effectués sur un appareil VARIAN HA 100, après trente passages.

Les spectres R.M.N. à 250 MHz sont effectués sur l'appareil THOMSON-C.S.F. TSN-250 en un seul passage.

BIBLIOGRAPHIE

[1] T. PURDIE, J.C. IRVINE
J. Chem. Soc., 1903, 83, 1021.

[2] W.N. HAWORTH
J. Chem. Soc., 1915, 107, 8.

[3] S. HAKAMORI
J. Biochem., 1964, 55(2), 205.

[4] D.M.W. ANDERSON, G.M. GREE
Carbohyd. Res., 1966, 2, 162.

[5] P.A. SANDFORD, H.E. CONRAD
Biochem., 1966, 5, 1508.

[6] N.W.H. CHEETHAM, R.J. Mc ILROY
Carbohyd. Res., 1969, 11, 187.

[7] G. KEILICH, P. SALMINEN, E. HUSEMAN
Abstract of Papers 158th ACS National Meeting Division of Cellulose, Wood and Fiber Chemistry n° 29, Sept. 1969.

[8] V.W. GOODLETT, J.T. DOUGHERTY, H.W. PATTON
Abstract of Paper 152th ACS National Meeting Division of Cellulose,Wood and Fiber Chemistry n° 27, Sept. 1966.

[9] V.W. GOODLETT, J.T. DOUGHERTY, H.W. PATTON
J. Polymer. Sci., 1971, 9, 155.

[10] D. HORTON et coll.
J. Org. Chem., 1969, 34, 86.

[11] L. ODIER
Thèse 3ème Cycle, Grenoble, 1968.

[12] E.B. RATTBONE, E.A.M. STEPHEN
Tetrahedron Lett., 1970, 16, 1339.

[13] W. GREEM
Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. III, 1963, 327.

[14] J.M. SUGIHARA, M.L. WOLFROM
J. Amer. Chem. Soc., 1949, 71, 3509.

[15] T.S. GARDNER, C.B. PURVES
J. Amer. Chem. Soc., 1942, 64, 1539.

[16] C.J. MALM, L.J. TANGHE, B.C. LAIRD
J. Amer. Chem. Soc., 1950, 72, 2674.

[17] D. GAGNAIRE, L. ODIER, M. VINCENDON
J. Polymer. Sci. Part. C, 1969, (28), 27.

[18] H.W. HEARON, G.D. HIATT, G.R. FORDYCE
J. Amer. Chem. Soc., 1943, 65, 2449.

[19] B. CASU, M. REGGIANI, G.G. GALLO, A. VIGEVANI
Tetrahedron, 1968, 24(2), 803.

[20] W.R.D. LEIGH
J. Chem. Soc., 1961, 754.

CHAPITRE III

BIOSYNTHESE DE LA CELLULOSE BACTERIENNE : POSSIBILITE D'UTILISATION DE LA R.M.N. DANS L'ETUDE DU MECANISME

Le problème de la biosynthèse de la cellulose contenue dans la paroi cellulaire des végétaux est très complexe et reste, malgré toutes les études consacrées à ce sujet, mal expliqué.

La synthèse comporte deux étapes : d'une part la synthèse chimique du polymère, c'est-à-dire la polymérisation de l'unité D-glucose, d'autre part l'arrangement des macromolécules pour former des microfibrilles et l'orientation de ces microfibrilles dans la paroi cellulaire. La paroi cellulaire étant elle même constituée de la paroi primaire dans laquelle les microfibrilles dans une matrice de pectines et d'hemicellulose ne sont pas orientées et de la paroi secondaire divisée en trois sous couches constituées de microfibrilles orientées.

La complexité du problème impose d'étudier une étape après l'autre sans cependant perdre de vue que ces deux étapes dépendent l'une de l'autre.

L'obtention in vitro de cellulose extracellulaire et microfibrillaire à partir de cultures d'Acetobacter xylinum [1, 2] ou d'Acetobacter acetigenum [3] s'effectue facilement en donnant une cellulose de haute pureté, avec des périodes de croissance courtes, à partir de D-glucose, mais également à partir de D-gluconate, de dihydroxyacétone, de glycérol [4]. Les études de mécanisme de biosynthèse ont principalement été conduites avec du D-glucose marqué au carbone 14. L'utilisation du glucose marqué en position spécifique sur le cycle, a permis après dégradation du polymère obtenu et récupération de l'unité glucose de vérifier la position de marquage du polymère par des méthodes radioactives [5].

Ainsi GREATHOUSE [6] a effectué des expériences de biosynthèse à l'aide de D-glucose-1-C14 et de D-glucose-6-C14 à partir de culture d'Acetobacter xylinum retrouve 96 °/₀ de la radioactivité initiale sur le carbone 1 du glucose après dégradation dans la première expérience et 82 °/₀ sur la position 1 dans la deuxième expérience.

Depuis ces expériences de nombreux chercheurs ont essayé de préciser les conditions de biosynthèse [7, 8, 9] en particulier GLASER [10] a été le premier à synthétiser la cellulose à partir d'uridine-diphospho-D-glucose (UDPG) en utilisant une source d'Acétobacter xylinum.

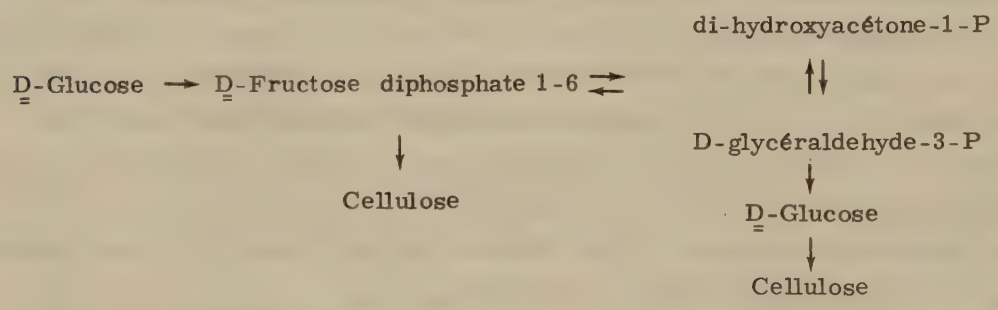
L'importance des précurseurs nucléotidiques dans la biosynthèse de la cellulose semble être admis en particulier l'influence favorable sur la biosynthèse de la présence d'adénosine triphosphate (ATP) comme source d'énergie [11, 12].

HASSID avec un système enzymatique particulaire (Ph aseolus aureus) a réussi à incorporer la guanosine-diphosphate D-glucose (GDPG) [13, 14, 15] avec une spécifité pour la base guanosine (les essais avec l'uracyl, l'adénine, la thymine et la cytosine ayant tous été négatifs).

Cependant le système est capable d'incorporer également le GDP-Mannose pour synthétiser d'autres polysaccharides, ce qui permet de penser que le GDPG est plutôt le précurseur de glucomannanes [16].

Il semble certain que la biosynthèse de la cellulose se fait à partir d'un précurseur nucléotidique, l'UDPG étant vraisemblablement la forme activée principale de l'incorporation du glucose.

Un autre problème important est de savoir quelle quantité de D-glucose est utilisée dans le métabolisme intermédiaire pour la production d'énergie, si une partie provenant de la dihydroxyacétone-1P (formée par le cycle d'Embden-Meyerhoff) n'est pas par la voie du glycérol-1-P reconvertie en glucose activé, incorporable dans la cellulose suivant le schéma :



Les expériences de biosynthèse avec des molécules marquées spécifiquement en une position ont pour but de choisir entre ces deux solutions. En fait, il semble qu'il se superpose les deux mécanismes, suivant la période de biosynthèse, l'initiation pouvant se faire par l'un des mécanismes et la synthèse par l'autre [5, 6, 17]. Le fait que l'Acétobacter puisse synthétiser la cellulose à partir de la glycérine est en faveur du deuxième mécanisme [18, 19, 20].

Toutes les études faites jusqu'à présent sur le mécanisme de biosynthèse de la cellulose l'ont été en utilisant du glucose ou d'autres sucres, marqués au Carbone-14. Récemment l'intérêt de molécules marquées au deutérium est apparu dans l'étude de ce problème [21].

Il nous a semblé que l'emploi de glucose deutérié ou d'eau lourde, associé à la R.M.N. comme procédé d'analyse permettrait un dosage du taux d'incorporation et de la localisation du deutérium précis que la spectroscopie infrarouge utilisée par CORRENS et DECHANT [21, 22] en transformant la cellulose obtenue en son dérivé triacétylé. En effet, dans le spectre du triacétate de cellulose effectué à 220 MHz [23] les sept protons du squelette ont pu être séparés et identifiés. La possibilité existe donc de doser le taux de deutériation pour chaque position, la finesse de cette analyse permettant à cette méthode d'apporter des éléments nouveaux dans l'étude de la biosynthèse.

L'objet de ce travail est de préciser quels fragments de la molécules de D-glucose l'on retrouve dans la cellulose par synthèse à partir du D-glucose-d_7 dans l'eau, du D-glucose

dans D_2O, et du D-glucose-d_7 dans D_2O en utilisant la Résonance Magnétique Nucléaire comme technique d'analyse du polymère obtenu.

D'autre part, dans le cadre de nos études sur les dérivés de la cellulose et sur les oligomères obtenus par hydrolyse de la cellulose [21, 25] il était intéressant pour nous d'obtenir un dérivé cellulosique partiellement deutérié. La synthèse bactérienne nous a semblé une voie pouvant répondre à cette question.

- Expériences réalisées et résultats

Nous avons obtenu la cellulose par synthèse à partir d'une souche d'Acétobacter xylinum (ATTC) par la méthode de HESTRIN [25] . En plus des produits toujours présents dans le milieu réactionnel (0, 5 °/₀ de bactopeptone, 0, 5 °/₀ d'extrait de levure, 0, 1 °/₀ de phosphate acide de potassium), celui-ci a été constitué de la façon suivante pour les quatre expériences réalisées :

. expérience A : D-Glucose et H_2O (biosynthèse habituelle)
. expérience B : D-Glucose-d_7 et H_2O
. expérience C : D-Glucose et D_2O
. expérience D : D-Glucose-d_7 et D_2O

Si la croissance de cellulose dans l'expérince A s'est faite normalement en une semaine, les durées sont supérieures dans les trois autres cas : 46 jours pour B , 15 jours pour C , 62 jours pour D . D'autre part, les rendements en cellulose sont inférieurs dans ces trois dernières expériences, on obtient 100 mg de cellulose pour 2 g de glucose introduit dans le milieu de culture.

La cellulose obtenue est lavée longuement à l'eau, puis à la soude à 1 °/₀ pendant une semaine, rincée par une solution d'acide acétique à 0, 5 °/₀, puis à l'eau. Elle est acétylée par la méthode habituelle : gonflage à l'eau, substitution par de l'acide acétique, acétylation par le milieu acide acétique-anhydride acétique-acide perchlorique. Le spectre R. M. N. de l'acétate de cellulose obtenu est donné par la figure 1. Il est réalisé à 100 MHz avec accumulation de spectres (CAT VARIAN). Il est identique à celui d'un acétate de cellulose d'origine quelconque sauf pour un point : dans le massif des trois groupes acétates (2, 11 ppm pour l'acétate primaire, 1, 92 et 1, 99 ppm pour les acétates secondaires) ; existent des impuretés à champ légèrement plus faible ou plus élevé. L'intensité intégrée totale de ces impuretés correspond environ à 1 proton (pour 9 protons acétate attendus) ; l'origine de ces protons n'a pas été élucidée mais il en est tenu compte dans les dosages des taux de deutériation effectués par la suite.

La figure 2 donne les spectres des sept protons du squelette (entre 3, 5 et 5, 2 ppm) des acétates obtenus dans les expériences A , B , C et D. La première information donnée par ces spectres résulte de l'intégration de la totalité de ce massif comparé à l'intensité des protons des groupes acétates :

. dans l'expérience B , il y a 35 °/₀ de protons H qui ont donc été échangés par rapport au glucose initial (d_7),

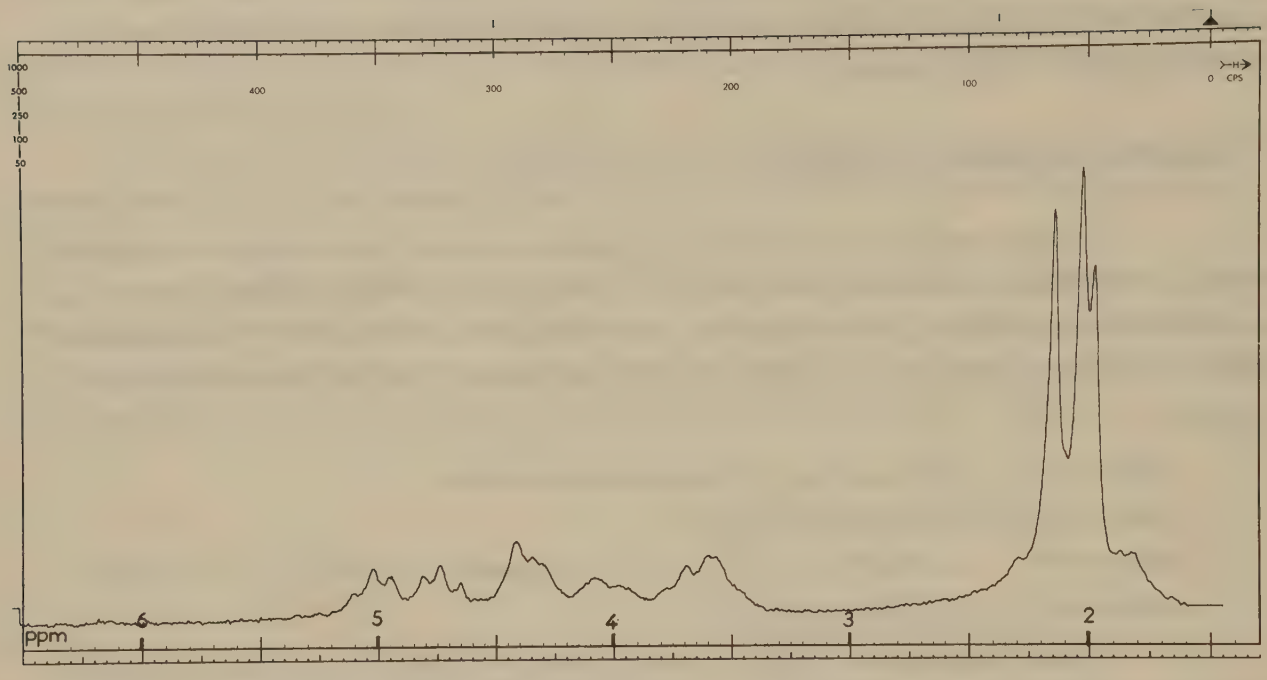


Figure 1 - Spectre du triacétate de cellulose bactérienne à 100 MHz (30 passages)

. dans l'expérience C , il y a 70 °/₀ de protons H , donc 30 °/₀ de deutérium provenant de D_2O,

. dans l'expérience D , il y a 20 °/₀ de protons H ne provenant ni du glucose (d_7), ni de l'eau (D_2O).

La séparation insuffisante des protons à 100 MHz rend impossible un dosage du taux de deutérium par position dans le squelette. Cette détermination a été rendue possible par des expériences réalisées à 250 MHz sur l'appareil THOMSON-C.S.F. TSN-250. La figure 3 donne les spectres réalisés à 250 MHz. Les conditions expérimentales permettent la séparation des signaux en six groupes : le doublet des protons 1 et le multiplet des protons 6' ne sont pas suffisamment distincts pour être séparés dans le cas des produits deutériés. L'identification des protons, rappelés sur la figure, a été effectuée dans le travail de FRIEBOLIN, KEILICH et SIEFERT déjà cité [23].

Le tableau I donne le pourcentage des protons présents sur chaque position du cycle (sauf pour 1 et 6 où la moyenne pour ces deux positions est indiquée).

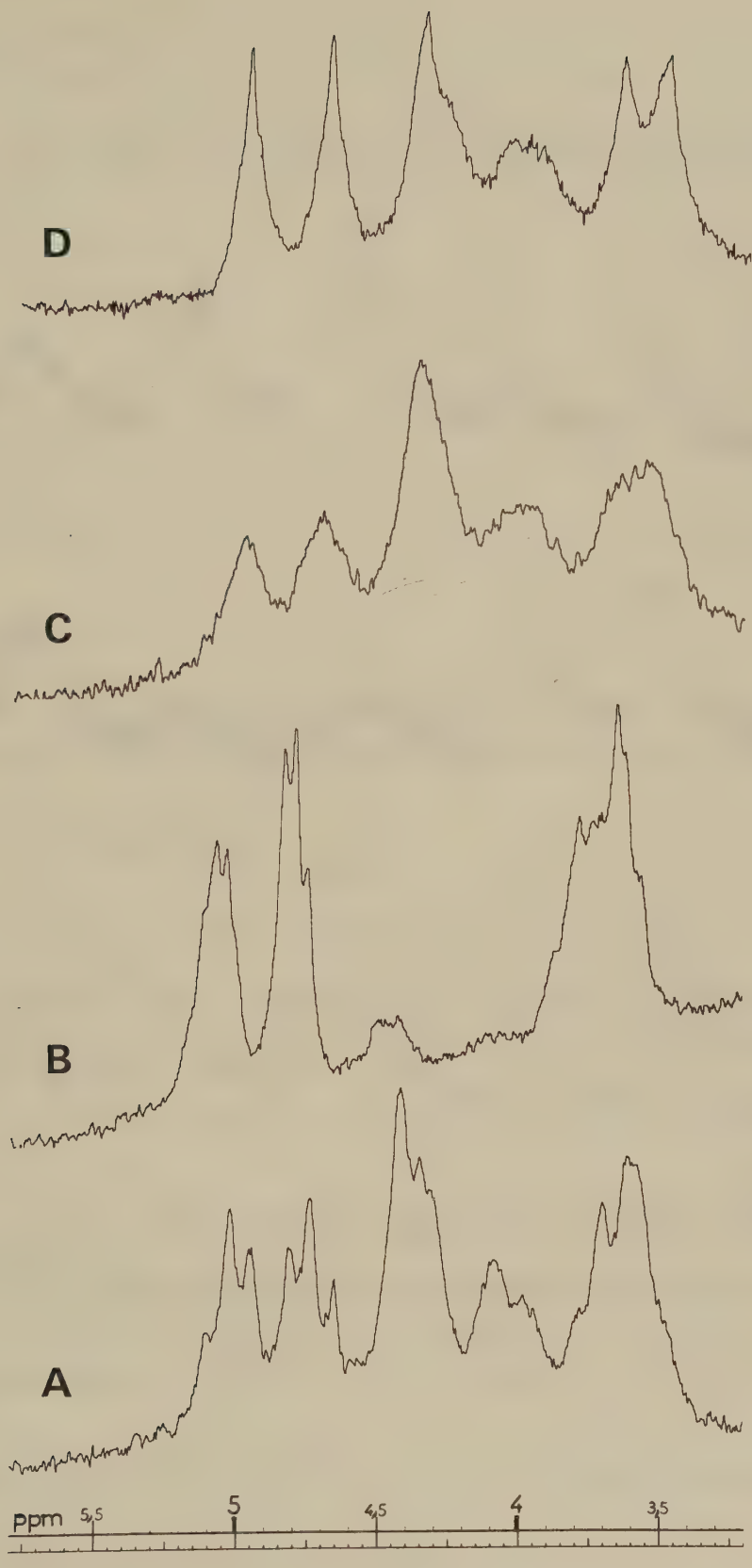


Figure 2 - Spectre des protons du triacétate de cellulose bactérienne à 100 MHz (30 passages).

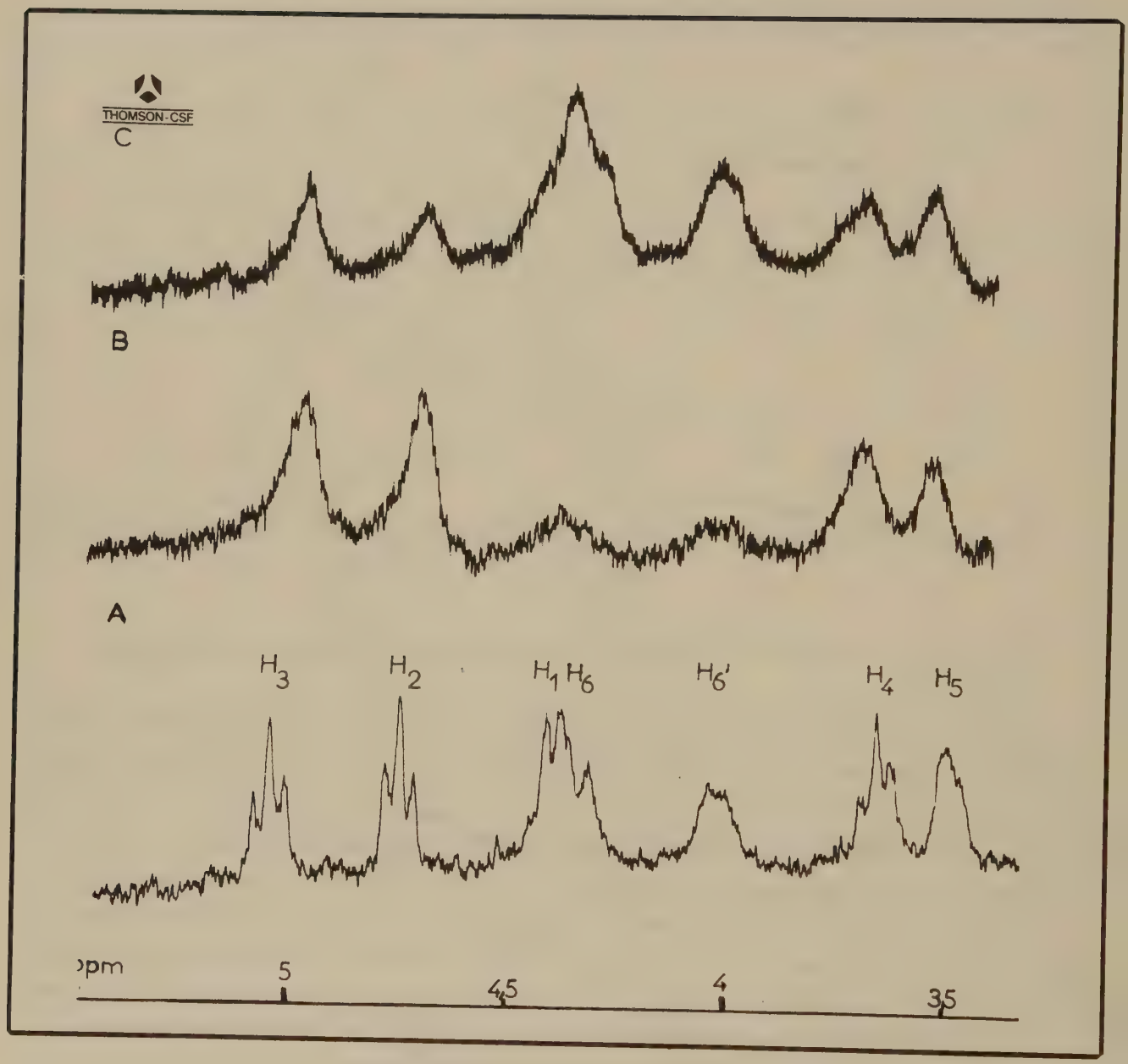


Figure 3 - Spectre des protons du triacétate de cellulose à 250 MHz

TABLEAU I

Pourcentage des protons présents sur les différentes positions du cycle

Protons	Expérience B (D-glucose-d_7 et H_2O)	Expérience C (D-glucose et D_2O)	Expérience D (D-glucose-d_7 et D_2O)
3	81	59	Environ 20 °/₀ sur toutes les positions (d'après les spectres à 100 MHz, figure 2).
2	58	59	
1 et 6	22	89	
6'	19	88	
4	39	59	
5	27	48	
Moyenne	35	70	

- Discussion des résultats

Bien que la précision sur les valeurs précédentes soit assez faible (quelques pour cent), des faits significatifs résultent des valeurs du tableau précédent et peuvent être discutés.

a) Discussion de l'expérience D

Cette expérience montre que, même avec l'emploi de D-glucose deutérié et d'eau lourde, 20 °/₀ environ de protons subsistent dans la cellulose formée. On doit cependant noter que dans ce cas la souche a été particulièrement longue à se développer (60 jours), ce qui favorise les échanges. Cette valeur de 20 °/₀ représente donc un maximum en ce qui concerne l'échange éventuel dans les autres expériences.

L'étude du spectre de l'acétate de cellulose formé (voir figure 2) permet deux autres conclusions :

- le taux d'échange est à peu près le même pour les sept positions du squelette (seuls les protons en 1 et 6 sont mal séparés).
- tous les signaux, sauf ceux situés en 6 et 6' sont relativement fins : ceci démontre que les différents protons observés ne sont couplés qu'avec du deutérium et non d'autres protons. L'échange est donc statistique (sauf peut être pour 6 et 6') : il n'existe pas de chaîne -CH-CH- directement incorporée.

b) Discussion des expériences B et C

Si les protons ou deutérium de la cellulose ne provenaient que du D-glucose et de l'eau (deutériés ou non), la somme des pourcentages des protons sur chaque position pour ces deux expériences serait de 100.

S'il y a un grand parallèle entre les deux expériences cette loi n'est cependant pas vérifiée : les différences expérimentales (durée et rendement) peuvent expliquer ces divergences. Les conclusions significatives suivantes peuvent cependant être obtenues :

- les hydrogènes en positions 1, 6, et 6' ne proviennent que d'une faible partie de l'eau ou des autres constituants du milieu (environ 10 °/₀ dans l'expérience C), et en très grande partie du glucose (environ 80 °/₀ dans l'expérience B). Cette conclusion est en accord avec les résultats qualitatifs obtenus en infra-rouge par CORRENS et DECHANT [21, 22] .
- au contraire, les quatre positions 2, 3, 4 et 5 de la cellulose proviennent en grande partie de l'eau du milieu de culture (environ 40 °/₀ en moyenne dans l'expérience C).

Ce fait peut s'expliquer par l'existence de formes cétoniques intermédiaires favorisant un échange de protons en α . Cependant, le passage par une cétone en position 3, par exemple, devrait conduire à 100 °/₀ de H en 3 dans l'expérience B , un échange partiel en 2 et 4 (valeurs expérimentales 58 °/₀ et 39 °/₀), mais ne permet pas d'expliquer l'échange en 5 (27 °/₀ observés expérimentalement.

- Expériences complémentaires

Etant donné que les positions 1 et 6 se comportent d'une manière différente des autres positions au cours de la biosynthèse, nous avons synthétisé deux dérivés deutériés du glucose en position spécifique :

- le D-glucose-1d et le D-glucose-66'-d_2

Le premier corps se prépare en une étape par réduction au borohydrure deutérié de la D-gluconolactone [27, 28] en milieu tamponné.

Le deuxième corps se prépare par réduction de la D-glucoronolactone dont les positions 1 et 2 ont été bloquées par un groupe isopropylidène [29, 30] .

Le contrôle de la deutériation de ces deux produits a été fait en spectrométrie de masse sur le dérivé acétylé [31] (figure 4).

Dans le cas du D-glucose-1d 95 °/₀ des molécules sont deutériées et le départ d'un ion fragment correspondant à l'élimination du carbone 1 et de l'oxygène du cycle, permet d'indiquer que tout le deutérium est en position 1. L'absence du pic à des masses plus élevées que celle de l'acétate de glucose (H = 391) permet d'exclure la présence de sorbitol, montrant ainsi la spécifité de la méthode de réduction.

Dans le cas du D-glucose-66'-d_2 , nous avons prélevé une partie de monoisopropylidène 1-2 D-glucofuranose obtenu après réduction, puis acétylé les positions 3, 5 et 6 comportant

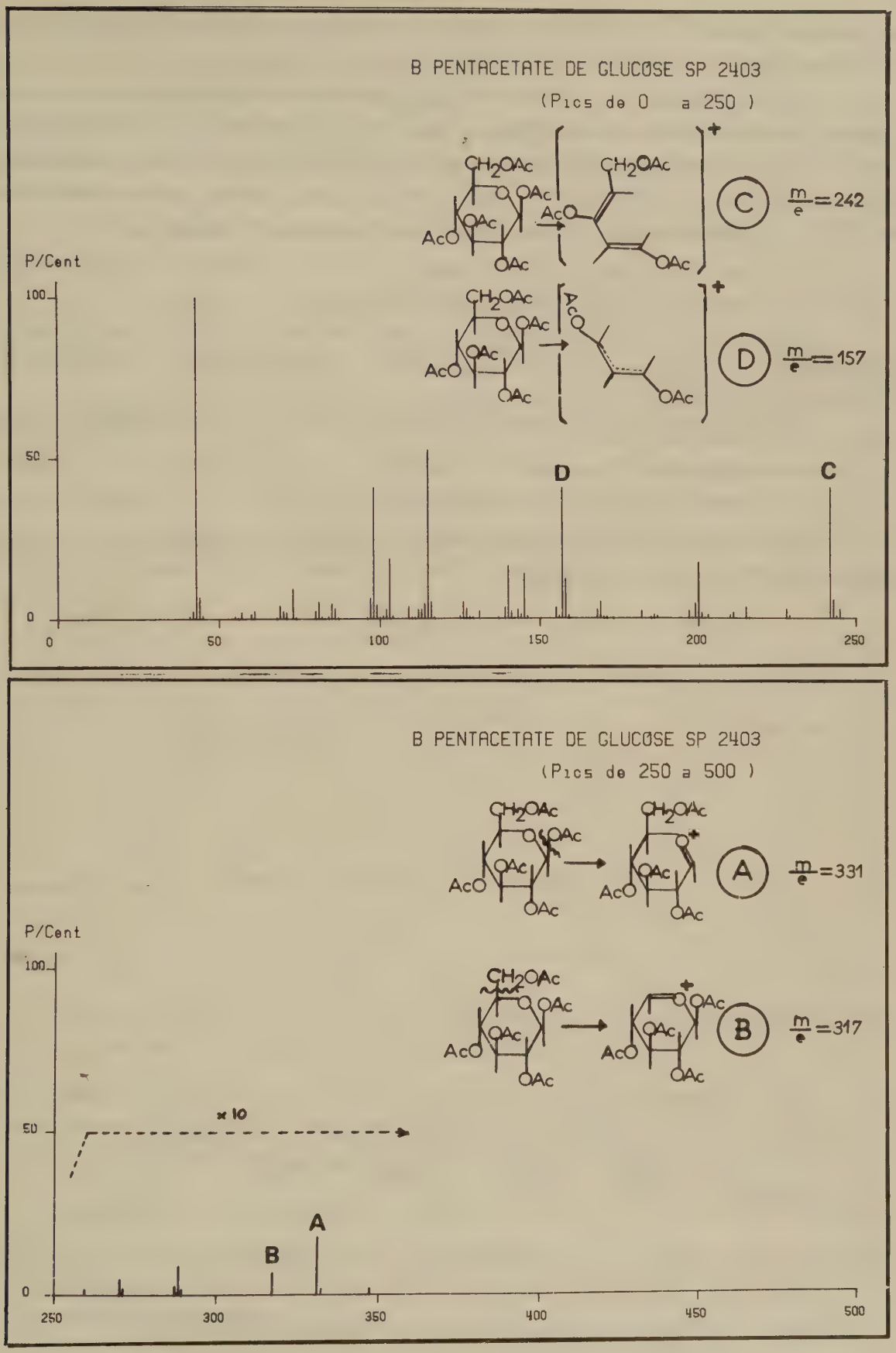


Figure 4 - Spectre de masse du pentaacétyl-β-D-glucopyranose.

une fonction alcool libre. On obtient ainsi le triacétyl-3-5-6-isopropylidène 1-2 D-glucofuranose dont les spectres R.M.N. [33] et de masse [32] sont bien connus.

En R.M.N. le spectre effectué dans C_6D_6 présente les sept protons séparés, ce qui permet un bon dosage du taux de deutériation. Dans notre cas, le fait que le proton H_5 sorte sous forme de doublet confirme la deutériation des deux protons H_6. Le fait qu'avec la sensibilité de la R.M.N. on ne trouve pas le proton H_6, permet d'affirmer que le taux de deutériation est supérieur à 95 °/₀. En spectrométrie de masse, on obtient les résultats suivants :

- 90 °/₀ des molécules sous forme d_2
- 10 °/₀ des molécules restantes sous forme d_1

La spectrométrie de masse ne permettant pas de choisir, sur cet exemple, la localisation du deutérium entre les positions 5 et 6.

Les deux expériences de biosynthèse ont été menées comme précédemment avec pour :

- l'expérience E : D-glucose 1-d + H_2O
- l'expérience F : D-glucose -6,6'-d_2 + H_2O

Les produits obtenus sont traités comme auparavant et les spectres obtenus dans ces expériences sont présentés sur la figure 5.

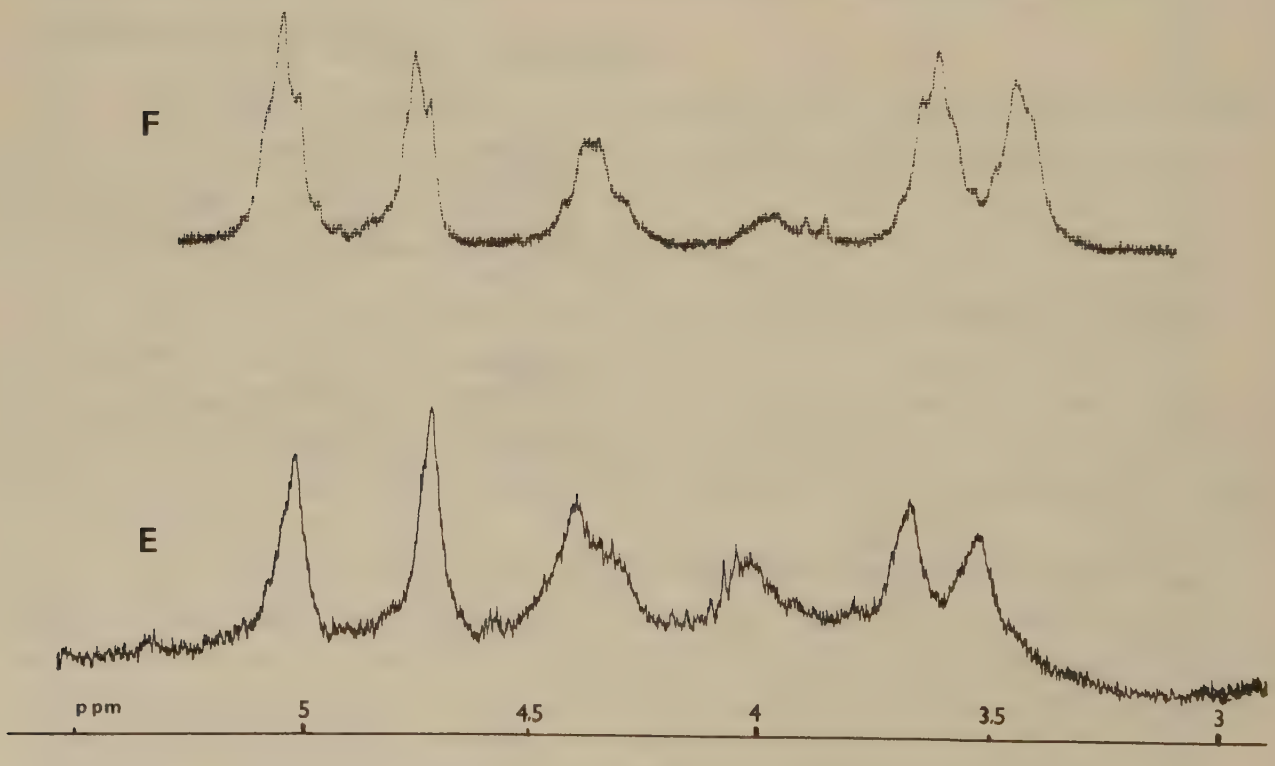


Figure 5 - Spectre des protons du triacétate de cellulose bactérienne à 250 MHz (Exp. E et F).

Dans l'expérience E l'intégration des protons par rapport aux acétates, indique qu'il a globalement 10 °/₀ de deutérium sur le cycle. L'intégration relative des différents protons, indique que le deutérium n'est situé qu'en position 1 ou 6 et 4 ou 5, les protons H_1 et H_6 se superposant. Mais si l'on considère les protons H_6 et $H_{6'}$ comme identiques et non échangés par des atomes de deutérium, puisque $H_{6'}$ ne l'est pas, on en déduit que 50 °/₀ des atomes de deutérium de la position 1 ont été échangés.

Dans l'expérience F , on trouve que le taux de deutériation global du cycle est de 36 °/₀, se répartissant entre la position 6 (78 °/₀) , la position 1 (58 °/₀) et la position 5 (13 °/₀).

Dans l'expérience F nous avons contrôlé par spectrométrie de masse les résultats donnés par le dosage R. M. N. Pour cela nous avons hydrolysé le triacétate de cellulose en glucose, du glucose nous sommes passés à l'acétate pour effectuer le spectre de masse (figure 6).

Le pic à $\frac{m}{e}$ = 331 (M-OAc) correspondant au fragment A permet de donner la composition des molécules de glucose en fonction du nombre total d'atomes de deutérium se trouvant sur le cycle. Ces résultats sont donnés par le tableau II. Le spectre permet également de donner, grâce aux fragments B, C, D, le taux de deutériation sur les positions 1 , 6 et le total des positions 2, 3, 4. On en déduit par différence la deutériation en position 5. Ces résultats comparés à ceux donnés par le dosage R. M. N. dans le tableau III montrent une bonne concordance des deux méthodes.

TABLEAU II

Nombre d'atomes de deutérium sur le cycle glucose dans l'expérience F	Quantité en °/₀
0	17
1	5
2	40
3	24
4	14

Les résultats du tableau II montrent, en considérant le fait que nous sommes partis de 90 °/₀ de D-glucose 6, 6' d_2 et de 10 °/₀ de D-glucose 6d :

- que l'on trouve une quantité importante de molécules n'ayant pas de deutérium (17 °/₀),
- que l'on retrouve principalement des molécules ayant deux atomes de deutérium (40 °/₀),
- que l'on obtient une quantité importante de molécules ayant trois atomes de deutérium (24 °/₀).

En comparant les deux expériences nous pouvons faire les constatations suivantes :

- lorsque la biosynthèse est effectuée à partir de D-glucose 1-d, 50 °/₀ des atomes de deutérium de la position 1 sont échangés, alors que dans les expériences précédentes, la position 1 ne s'échangeait qu'à 20 °/₀ environ.

Dans ce cas le deutérium se retrouve essentiellement en position 5.

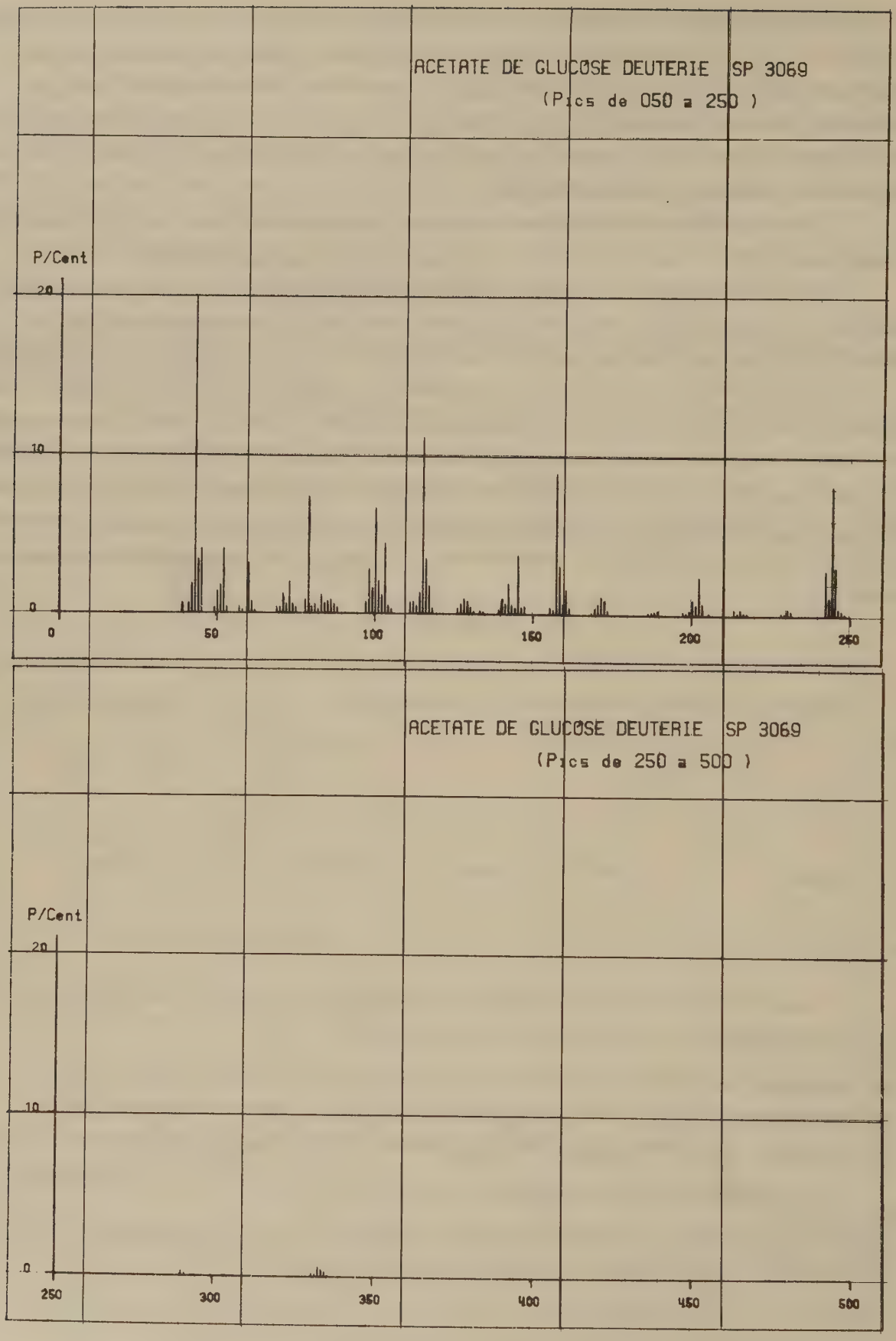


Figure 6 - Spectre de masse du pentaacétyl D-glucopyranose obtenu par hydrolyse de la cellulose de l'expérience F.

TABLEAU III

Pourcentage des protons présents sur les différentes positions du cycle

Expérience / Protons	E D-glucose 1d + H_2O	F D-glucose 6-6' d_2 + H_2O	
	Dosage R.M.N.	Dosage R.M.N.	Dosage spectrométrie de masse
H_3	100	100	100
H_2	100	75	100
H_1	50	42	37
H_6 $H_{6'}$	100	22	26,5
H_4	100	100	100
H_5	80	87	76
Moyenne	90	64	67

- lorsque la biosynthèse est effectuée à partir de D-glucose-6 6'-d_2 environ 25 °/₀ des atomes de deutérium sont échangés, conformément aux expériences précédentes où le pourcentage de cette position varie de 20 à 25 °/₀ .

Les atomes de deutérium dans cette expérience se retrouve essentiellement en position 1 et en position 5.

Dans les deux cas la position 5 paraît s'échanger d'une manière notable, par contre il n'y a pas réversibilité en ce qui concerne l'échange des positions 1 et 6 : il y a passage des atomes de deutérium de la position 6 à la position 1, alors que la transposition inverse ne se produit pas.

De toutes les expériences faites, on peut en déduire que l'effet isotopique du deutérium est très fort dans le mécanisme de biosynthèse de la cellulose, par le rendement faible, et par la période d'inhibition de la biosynthèse. Cela se traduit par des périodes de biosynthèse très élevées par rapport aux expériences sur le produit non marqué. Et ceci est particulièrement net chaque fois que le glucose est deutérié en position 1, dans l'expérience B, (D-glucose d_7) et l'expérience E (D-glucose 1d). Ceci peut s'expliquer par l'effet sur la synthèse enzymatique d'un précurseur nucléotidique lié à la position 1 du glucose, cette synthèse étant une étape nécessaire de la biosynthèse de la cellulose.

La comparaison des résultats obtenus au cours de ce travail en partant directement de glucose et des résultats que l'on pourrait obtenir en partant de précurseurs du type UDPG ou GDPG dont les molécules de glucose seraient marquées au deutérium pourrait répondre à cette question.

Ces expériences effectuées à partir de molécules marquées au deutérium, bien que produisant un effet isotopique intense sur le mécanisme de biosynthèse, sont les seuls capables de mettre en évidence des intermédiaires oxydés.

En ce qui concerne l'étude physico-chimique des dérivés de la cellulose, ces expériences, en permettant d'introduire du deutérium préférentiellement sur certaines positions donnent la possibilité d'envisager l'étude des mouvements de ces macromolécules en solution par l'intermédiaire des largeurs de raies des spectres de résonance.

PARTIE EXPERIMENTALE

1 - Biosynthèse de la cellulose [26]

La synthèse est conduite avec une souche d'Acéto-bacter xylinum de l'American Type Tissue Culture Collection sur un milieu contenant 0,5 °/₀ de bactopeptone (NBC), 0,5 °/₀ d'extrait de levure, 2 °/₀ de glucose et 0,1 °/₀ d'hydrogène phosphate de potassium.

Dans le cas de culture normale, la cellulose est récoltée au bout de 7 jours.

Dans le cas de la synthèse sur eau lourde avec du glucose-d_7, la récolte n'a été possible qu'au bout de deux mois. La pellicule de cellulose est lavée longuement à l'eau, puis immergée pendant une semaine dans une solution de soude à 1 °/₀. La pellicule est alors lavée par l'eau, puis neutralisée par une solution d'acide acétique à 0,5 °/₀ et rincée à l'eau. Dans toutes les expériences avec les molécules deutériées, 1 g de glucose donne environ 100 mg de triacétate de cellulose.

Dans tous les cas, sauf dans l'expérience D (D-glucose-d_7 D_2O) nous avons effectué deux expériences de biosynthèse positives.

2 - Acétylation de la cellulose [34]

L'acétylation de 20 g de cellulose gonflée d'eau (contenant environ 99 °/₀ de son poids en eau) a été effectuée de la manière suivante :

La cellulose est échangée plusieurs fois par l'acide acétique, puis après élimination de l'excès d'acide par filtration sous vide, elle est mise en suspension dans un mélange contenant 20 cm^3 d'acide acétique, 20 cm^3 d'anhydride acétique, 0,3 cm^3 d'acide perchlorique à 65 °/₀.

Après 72 heures d'agitation, il se forme une solution trouble qui est précipité dans un excès d'eau. Le précipité est lavé abondamment à l'eau, jusqu'à neutralité des eaux de lavage puis par alcool. Le produit est ensuite séché sous vide.

3 - Synthèse de D-glucose-1-d [27, 28]

On dissout 10 g de D-gluconolactone (1/18 mole) (FLUKA) dans 100 cm^3 de D_2O. Cette solution est maintenue à 0°C. On ajoute alors par petites fractions 1 g de $NaBD_4$ ($\frac{1}{42}$ mole) en

solution dans 25 cm^3 de D_2O ; en maintenant le pH entre 3 et 4 par addition de H_2SO_4 normal.

10 minutes après la fin de la réaction, on amène la solution à pH = 2 par addition de H_2SO_4.

La solution est alors passée sur 10 g de résine Amberlite IR 120 H^+ de manière à éliminer les ions Na^+ de la solution, le pH passe de 2 à 1. La colonne de résine est lavée jusqu'à neutralisation et les eaux de lavage jointes à la solution déminéralisée.

Cette solution est alors passée sur une colonne contenant 15 g de résine Amberlite 45 - OH^- . La solution à la sortie de la colonne est revenue à pH = 5. On a ainsi éliminé le bore.

La solution est alors évaporée sous vide en chauffant entre 40 et 50°C. On obtient 9,38 g de produit huileux qui est redissous dans 20 cm^3 d'un mélange Ethanol-eau (80 °/₀, 20 °/₀). Dans cette solution mise au frigidaire, cristallise 7,09 g de produit après plusieurs opérations.

Le D-glucose-1 d ainsi obtenu est utilisé pour la biosynthèse.

- Contrôle du taux de deutériation

450 mg de D-glucose-1 d préparé sont acétylés dans 4 cm^3 de pyridine et 4 cm^3 d'anhydride acétique, une nuit à température ambiante.

Le produit est précipité dans l'eau et recristallisé dans l'alcool.

En spectrométrie de masse, on ne trouve pas de trace d'hexaacétate de sorbitol (M = 434), montrant ainsi que la méthode de réduction, permet bien de s'arrêter au sucre et non de passer à l'alditol.

On trouve 95 °/₀ des molécules au pic $\frac{m}{e} = 391$, indiquant ainsi que le taux de deutériation est de 95 °/₀.

D'autre part, le départ d'un ion fragment correspondant à l'élimination du carbone 1 et de l'oxygène du cycle permet d'indiquer que la totalité du deutérium se trouve sur le carbone 1.

4 - Synthèse du D-glucose-6,6'-d_2 [29, 30]

Isopropylidène 1-2 D-glucurono 1-4 lactone : On prend 45 g de D-glucorono 1-4 lactone commerciale (FLUKA) que l'on dissout dans 1 litre d'acétone anhydre. On ajoute alors 5 cm^3 d'acide sulfurique concentré et on agite pendant 24 heures à température ambiante. La lactone passe en solution.

On passe alors la solution obtenue sur une colonne contenant 65 g de résine Amberlite IR 45-OH, préalablement lavée à l'eau et à l'acétone. On élimine ainsi les ions SO_4^{--} . Le filtrat est évaporé et le produit obtenu a un point de fusion de 110°C.

Le produit solide est redissous dans le mélange éther de pétrole-éther éthylique (50/50) et cristallisé au frigidaire. On obtient 29 g de produit dont le point de fusion est : F 115°C D-glucose 6,6'-d_2 : 26 g du produit précédent (1/8 mole) sont dissous dans 350 cm^3 d'eau. On ajoute goutte à goutte à cette solution 5 g de $NaBD_4$ ($\sim \frac{1}{8}$ mole) en solution dans 60 cm^3 d'eau. 10 minutes après la fin de l'addition on ajoute 1 g de $NaBD_4$ en solution dans 10 cm^3 d'eau. On laisse la réaction s'effectuer pendant 2 heures. On prélève alors 20 cm^3 de la solution

de manière à isoler le mono-O-isopropylidène 1,2-D glucofuranose puis on ajoute 5 cm^3 d'acide sulfurique 6N et l'on porte à ébullition pendant 2 heures, pour éliminer le groupe isopropylidène. La solution est alors passée sur 50 g de résine Amberlite IR 120-H^+ puis sur 80 g de résine Amberlite 45-OH. Après lavage abondant des deux colonnes, la solution est évaporée sous vide et on obtient 13 g de produit.

Le D-glucose 6,6' d_2 est recristallisé dans l'alcool à 95 °/₀.

- Caractérisation du produit

La caractérisation a été faite sur le mono-O-isopropylidène 1-2 D-glucofuranose isolé après la réduction et traité sur résine comme le glucose.

200 mg de ce produit sont acétylés dans 2 cm^3 d'anhydride acétique et 2 cm^3 de pyridine pendant 16 heures à température ambiante. Le produit est précipité dans 5 cm^3 d'eau glacée, puis recristallisé dans l'alcool à 95 °/₀. On obtient 125 mg de produit dont le point de fusion est de 60°C. Le spectre de R.M.N. de ce produit est intéressant, car les sept protons sont entièrement séparés et cela permet de faire un dosage du taux de deutériation, pour la R.M.N. les protons 6 ont entièrement disparu, c'est-à-dire que le taux de deutériation, compte tenu de la sensibilité de la R.M.N., est supérieur à 95 °/₀ .

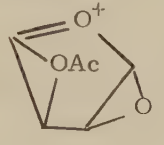
- Spectrométrie de masse

. Pic moléculaire à m/e = 348 très faible.

. Pic de base à m/e = 333 = M-15, correspondant à l'élimination de CH_3 du groupe isopropylidène. Ce pic permet de déduire que :

- 90 °/₀ de molécules sont sous forme d_2
- les 10 °/₀ qui restent sont sous forme d_1

. Pic à m/e = 201 correspond à la fragmentation entre C_4 et C_5, ce pic permet d'indiquer que tout le deutérium se répartit entre les deux positions 5 et 6.

Le pic à m/e = 143 correspondant à l'ion 

donne les mêmes résultats.

5 - Hydrolyse du triacétate de cellulose [35]

45 mg de triacétate de cellulose dans l'expérience E (D-glucose 1-d, H_2O) sont mis en suspension dans 1 cm^3 de H_2SO_4 concentré, avec agitation pendant 2 heures jusqu'à dissolution. On ajoute alors 8 cm^3 d'eau, de manière à obtenir une solution acide à 8 °/₀. Cette solution est portée à l'ébullition pendant 4 heures.

On passe alors cette solution sur une colonne contenant 30 g de résine Amberlite IR 45-OH. Le pH de cette solution passe de 1 à 5. La solution est alors évaporée sous vide en chauffant à 40-50°C. On obtient 20 mg de produit huileux.

- Acétylation

Le produit obtenu ci-dessus est acétylé dans un mélange de 1 cm^3 de pyridine anhydre et 1 cm^3 d'anhydride acétique pendant 16 heures à température ambiante. La solution est précipitée dans 5 cm^3 d'au glacée. On récupère 15 mg de produit solide dont on effectue le spectre de masse.

6 - Spectres R.M.N.

Les spectres R.M.N. à 100 MHz ont été effectués sur un appareil VARIAN HA 100, en utilisant la technique de stockage (30 à 40 passages). Les spectres R.M.N. à 250 MHz ont été effectués sur un appareil THOMSON-C.S.F. expérimental, en effectuant un seul passage à température ambiante.

Dans tous les cas le produit est dissous dans $CDCl_3$ (40 mg/0,5 cm^3) en utilisant le TMS comme référence interne.

Nous remercions Monsieur J.J. DUNAND de la Société THOMSON-C.S.F. pour l'aide qu'il nous a apportée.

BIBLIOGRAPHIE

[1] K. MÜHLTHALER
Biochem. Biophys. Acta., 1949, 3, 527.

[2] F.W. MINOR, G.A. GREATHOUSE, H.G. SHIRK, A.M. SCHWARTZ, M. HARRIS
J. Amer. Chem. Soc., 1954, 76, 1658.

[3] K.S. BARCLAY, E.J. BOURNE, M. STACEY, M. WEBB
J. Chem. Soc., 1954, 1051.

[4] M. SCHRAMM, Z. GROMENT, S. HESTRIN
Bull. Res. Council Israel, 5A, n° 1, 1955, 99.

[5] R.G. EVERSON, J.R. COLVIN
Canad. J. Biochem., 1966, 44(11), 1567.

[6] G.A. GREATHOUSE
J. Amer. Chem. Soc., 1957, 79, 4505.

[7] D.O. BRUMMOND, A.P. GIBBONS
Biochem. Z., 1965, 342, 308.

[8] Cl. VILLEMEZ, G. FRANZ, W. Z. HASSID
Plant. Physiol., 1967, 42, 1219.

[9] A. PINSKY, L. ORDIN
Plant. and Cell. Physiol., 1969, 10, 771.

[10] L. GLASER
J. Biol. Chem., 1958, 232, 627.

[11] G.A. GREATHOUSE
J. Amer. Chem. Soc., 1957, 79, 4503.

[12] J.R. COLVIN
Arch. Biochem. Biophys., 1957, 70, 294.

[13] A.D. ELBEIN, G.A. BARBER, W.Z. HASSID
J. Amer. Chem. Soc., 1964, 86, 309.

[14] G.A. BARBER, W.Z. HASSID
Biochem. Biophys. Acta, 1964, 86, 397.

[15] G.A. BARBER, W.Z. HASSID
Nature, 1965, 207, 80.

[16] C.L. VILLEMEZ, J.S. HELLER
Nature, 1970, 227, 80.

[17] M. MARX-FIGINI
J. Polym. Sci. Pt C, 1967, 16, 1947.

[18] H.L.A. TARR, H. HIBBERT
Canad. J. Research, 1930, 4, 372.

[19] M. BENZIMAN, H. BURGER-RACHAMINNOV
J. Bacteriol, 1962, 84, 825.

[20] G.A. WHITE, C.H. WANG
Biochem. J., 1964, 90, 408.

[21] E. CORRENS, J. DECHANT
Faser. Forch Text, 1968, 19(99), 393.

[22] J. DECHANT
Faser. Forch. Text., 1968, 19(11), 491.

[23] H. FRIEBOLIN, G. KEILICH, E. SIEFERT
Angew. Chem. Intern. Ed., 1969, 8, 766.

[24] D. GAGNAIRE, L. ODIER, M. VINCENDON
J. Polymer. Sci. Pt C, 1969, 28, 27.

[25] D. GAGNAIRE, M. VINCENDON
Bull. Soc. Chim., 1965, 472.

[26] S. HESTRIN
Methods in Carbohydrate Chemistry, vol. III, 1963, 4.

[27] M.L. WOLFROM, H.B. WOOD
J. Amer. Chem. Soc., 1951, 73, 2933.

[28] M. ABDELAKHER, J.K. HAMILTON, F. SMITH
J. Amer. Chem. Soc., 1951, 73, 4691.

[29] J.C. SOWDEN
J. Amer. Chem. Soc., 1952, 74, 4377.

[30] L.N. OWEN, S. PEAT, W.J.G. JONES
J. Chem. Soc., 1941, 339.

[31] K. BIEMAN, D.C. DE JONGH, K. SCHNOES
J. Amer. Chem. Soc., 1963, 85, 1763.

[32] D.C. DE JONGH, K. BIEMAN
J. Amer. Chem. Soc., 1964, 86, 67.

[33] L.D. HALL
Adv. Carbohyd. Chem., vol. 19, 1964.

[34] Meth. in Carbohyd. Chem., Vol. III, 1963, 193.

[35] I. CROON, B. LINDBERG
Swensk Papperstid., 1957, 50, 843.

CHAPITRE IV

ETUDE DE L'EXTREMITE DE CHAINES DE POLYSACCHARIDES PAR R.M.N. ET DE LEUR REACTIVITE

L'extrémité anomère des sucres est différente des autres positions, par la réactivité du groupe OH. De même, le proton anomère se comporte d'une manière particulière en R.M.N., de nombreuses études de sucres libres ou substitués l'ont montré [1, 2].

Dans la série du glucose, l'hydrogène porté par le carbone anomère (H_I) est :

- d'une part, le plus déplacé,
- d'autre part, est différent suivant qu'il est axial ou équatorial, le proton en position équatoriale (H_{Ie}) étant plus déplacé et ayant un couplage faible avec le proton H_2 ($J_{HI\,e\text{-}H2}$ = 3 à 4 Hz) alors que le proton en position axiale (H_{Ia}) est moins déplacé, avec une constante de couplage beaucoup plus grande ($J_{HI\,a\text{-}H2}$ = 7 à 9 Hz). La différence de réactivité de la position anomère sur les mono et disaccharides est illustrée par les nombreuses études sur les osides. De même, pour les oligosaccharides, WOLFROM [3, 4] a montré, en séparant la différents méthyloligosides, à partir des produits de dégradation de la cellulose, la différence de réactivité de leur position anomère.

Dans ce laboratoire, nous avons montré que la spécificité de la résonance des protons anomères H_1 se conservait pour les acétates d'oligosaccharides [5] produits dans la dégradation de la cellulose et pour le triacétate de cellulose [6].

1 - Interprétation des spectres de disaccharides peracétyles

Si l'on étudie l'évolution des spectres R.M.N. des monomères et des dimères du triacétate de cellulose et l'amylose, c'est-à-dire l'α et le β pentaacétate de glucose et l'α et le β octaacétate de cellobiose pour la cellulose, l'α et le β pentaacétate de glucose et l'α et le β octaacétate de maltose pour l'amylose, on s'aperçoit que les doublets des protons anomères se trouvent plus déplacés vers les champs faibles que les autres protons du cycle, et qu'ils gardent sensiblement le même déplacement chimique lorsqu'on passe du glucose au cellobiose ou du glucose au maltose.

L'interprétation des spectres des α et β pentaacétyl-D-glucopyranose a été faite par LEMIEUX [2]. Leur spectre à 100 MHz en solution dans $CDCl_3$ est montré à la figure 1

avec l'attribution des différents protons faite par cet auteur.

Sur le spectre de l'isomère α (figure 1a), on note que le doublet $H_{1\,\alpha}$ est à 6, 25 ppm ($J_{H1\ H2}$ = 4 Hz) et que le proton H_3 est plus déplacé vers les champs faibles à 5, 44 ppm, que les autres protons portant un acétate secondaire.

Sur le spectre de l'isomère, β seul le doublet $H_{1\,\beta}$, est plus déplacé vers les champs faibles à 5, 75 ppm ($J_{H1\ H2}$ = 7 Hz).

Si l'on compare ces deux spectres en prenant le β pentaacétate de glucose dans lequel tous les acétates sont équatoriaux, on voit que le passage de l'acétate de la position équatoriale (isomère β) à la position axiale (isomère α) se traduit par le déplacement des deux protons axiaux en positions 3 et 5 vers les champs faibles noté par LEMIEUX.

Les spectres de l'α et du β octaacétate de cellobiose à 100 MHz sont donnés par les figures 2 et 3. On note la complexité beaucoup plus grande des spectres lorsqu'on passe d'une unité glucose à deux unités glucose liées en β 1-4.

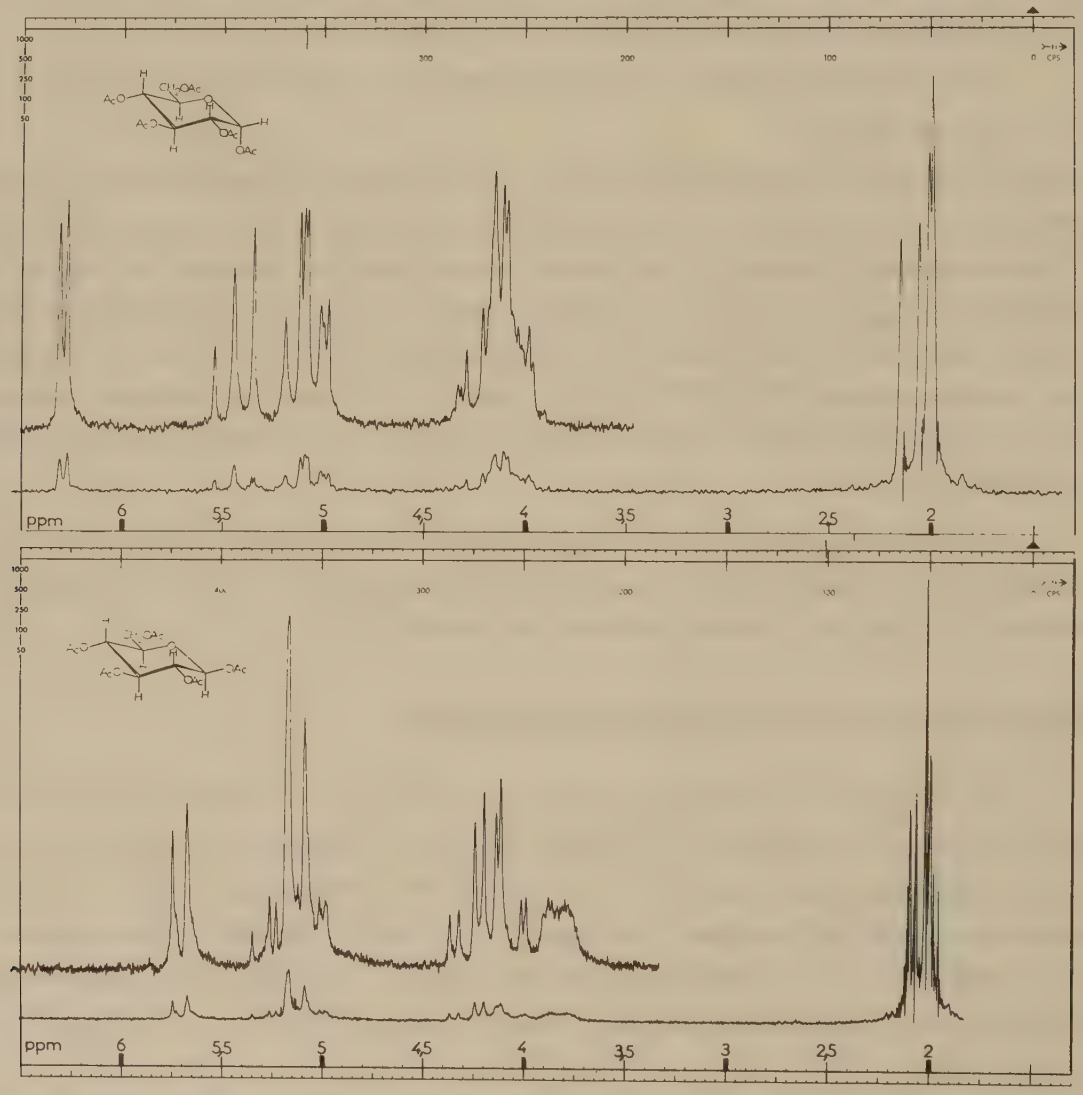


Figure 1 - Spectre des pentaacétyl α et β D-glucopyranose à 100 MHz.

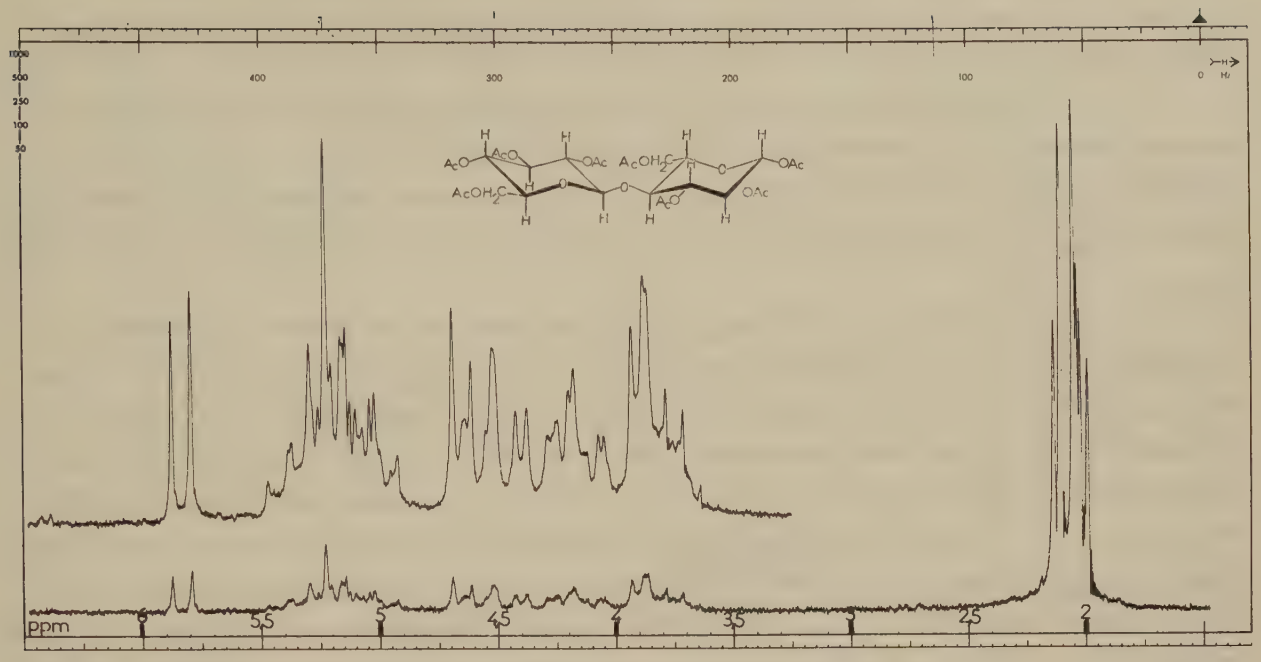


Figure 2 - Spectre de α octaacétate de cellobiose à 100 MHz.

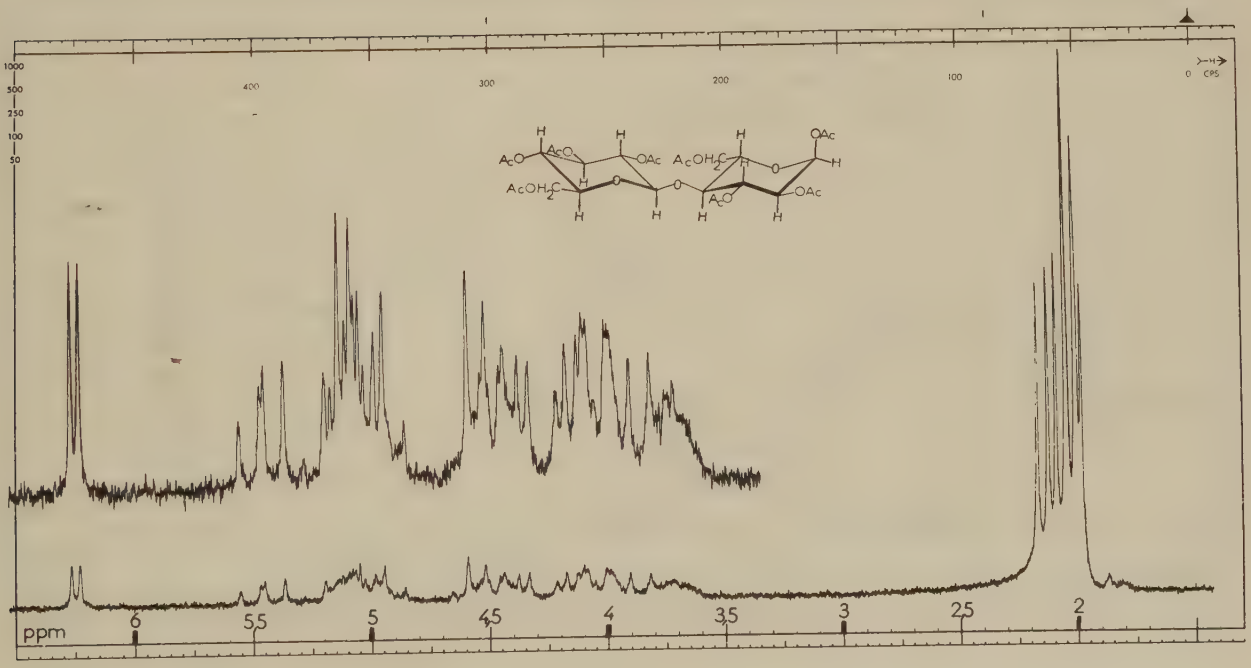


Figure 3 - Spectre du β octaacétate de cellobiose à 100 MHz.

Sur le spectre de l'isomère α, deux protons sont séparés du massif des douze autres : le proton anomère $H_{1\,\alpha}$ à 6,24 ppm ($J_{H_1\,H_2}$ = 3,5 Hz) et un quadruplet centré sur 5,45 ppm. Sur le spectre de l'isomère β, seul le proton anomère $H_{1\,\beta}$ à 5,80 ppm ($J_{H_1\,H_2}$ = 8 Hz) est séparé des autres.

En ce qui concerne le maltose, dimère du triacétate d'amylose seul l'isomère β peut être préparé pur, il n'existe pas de méthode pour obtenir l'isomère α. Le spectre du β octaacétate de maltose est donné par la figure 4, ce spectre montre que seul le doublet du proton anomère $H_{1\,\beta}$, se trouve plus déplacé vers les champs faibles que les autres protons à 5,75 ppm ($J_{H_1\,H_2}$ = 7,5 Hz).

Les spectres à 100 MHz de cette série de disaccharides permet de constater la continuité de la fréquence de résonance des protons anomères $H_{1\,\alpha}$ et $H_{1\,\beta}$ à 6,25 et 5,75 ppm, avec une faible variation de la constante de couplage $J_{H_1\,H_2}$. Dans la série α un triplet d'intensité égale à un proton se trouve plus déplacé que les autres à 5,45 ppm. Ce triplet unique peut soit appartenir au cycle anomère A soit au cycle terminal B. Comme les spectres à 100 MHz ne permettent pas l'analyse de tous les protons des deux cycles, par suite du recouvrement de leurs raies de résonance, nous avons effectué les spectres de ces trois disaccharides à 250 MHz sur un appareil THOMSON-C.S.F. TSN-250 dans les mêmes conditions qu'à 100 MHz. Le fait de multiplier par 2,5 la fréquence de résonance permet d'étaler le spectre en fréquence et d'éviter ainsi le recouvrement des différents protons. Les spectres de l'α et du β octaacétate de cellobiose ainsi que celui du β octaacétate de maltose à 250 MHz sont donnés par les figures 5, 6 et 7.

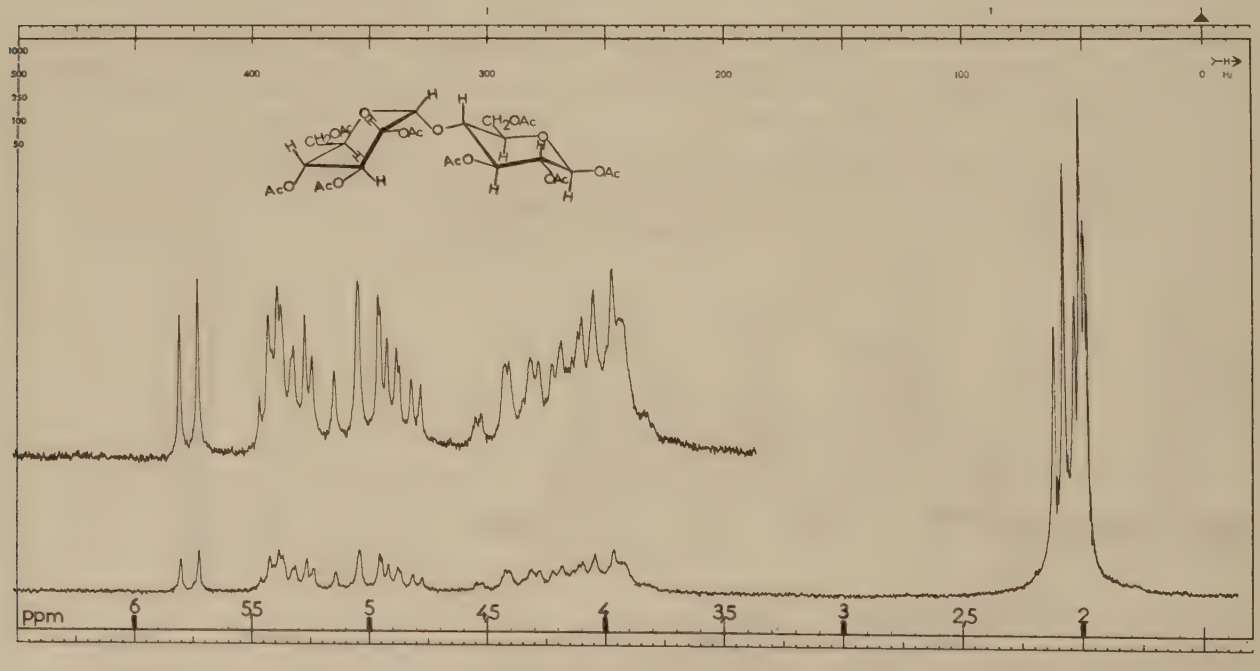


Figure 4 - Spectre du β octaacétate de maltose à 100 MHz.

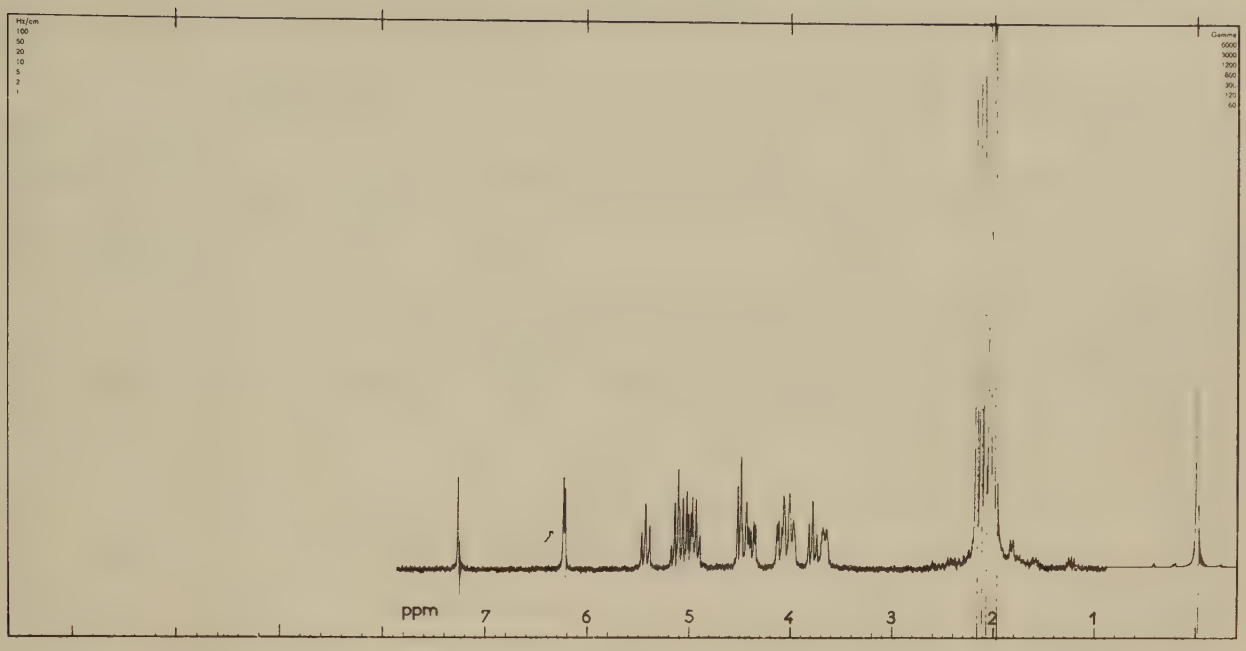


Figure 5 - Spectre de l'α octaacétate de cellobiose à 250 MHz.

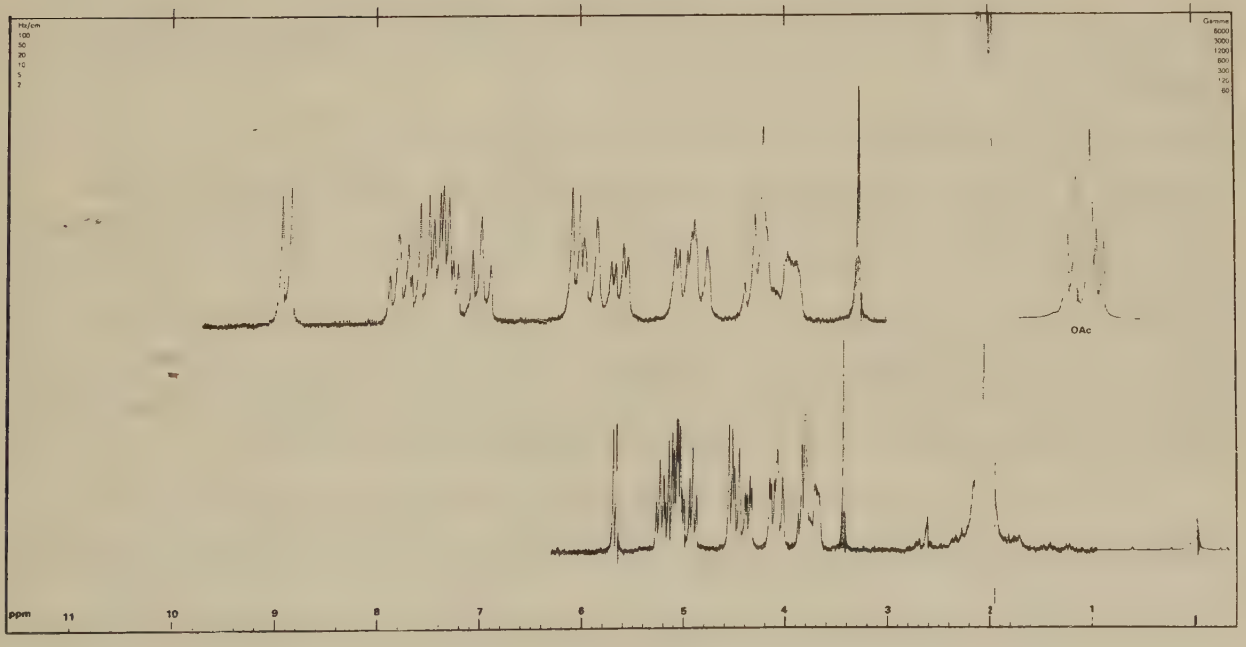


Figure 6 - Spectre du β octaacétate de cellobiose à 250 MHz.

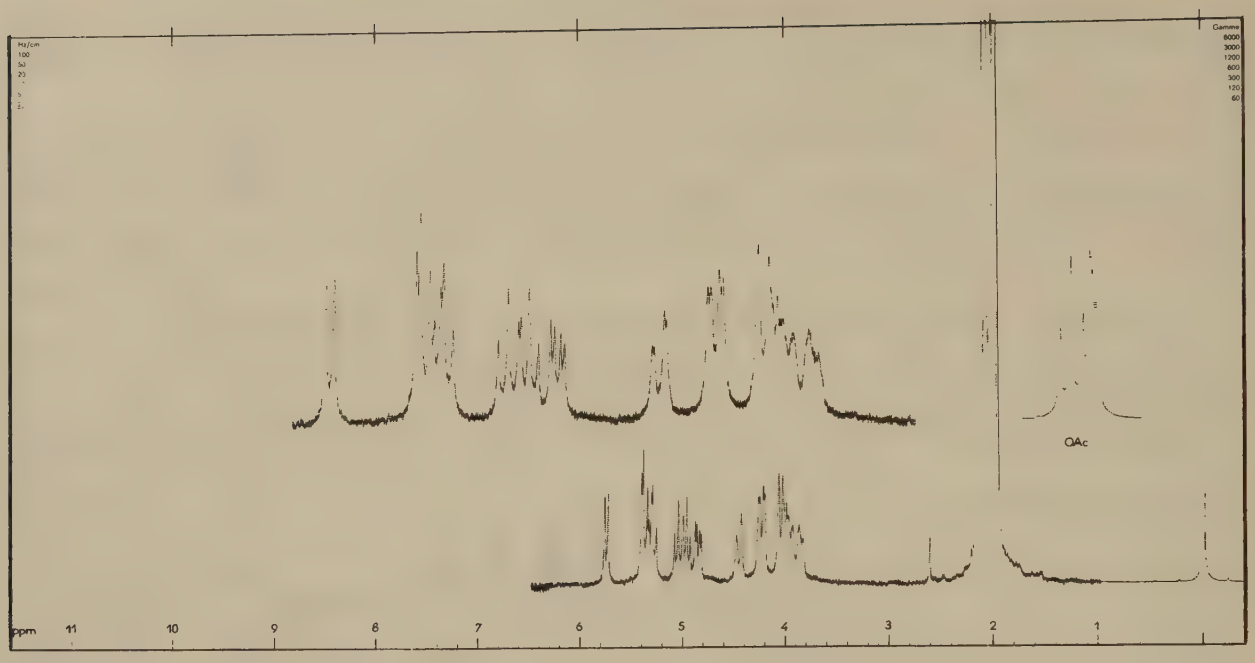


Figure 7 - Spectre du β octaacétate de maltose à 250 MHz.

On note sur ces spectres que les quatorze protons sont pratiquement séparés et donnent des spectres analysables au premier ordre. Les protons se répartissent en quatre groupes :

- les protons H_1 sortent sous forme d'un doublet d'écart égal à $J_{H_1\ H_2}$.
- les protons H_2, H_3 et H_4 sortent sous forme de triplets, puisqu'ils sont couplés à deux protons voisins diaxiaux (Dans le cas des isomères α le proton H_{2A} sort sous forme d'un quadruplet).
- les protons H_5 constituent la partie X du système ABX formé par les protons H_5, H_6, $H_{6'}$ cette partie X étant dédoublée par le couplage avec H_4, sort sous forme d'un octet.
- les protons H_6 et $H_{6'}$, constituent la partie AB du système ABX précédent, sortent sous la forme de deux quadruplets, avec un couplage moyen et un couplage faible.

Pour essayer d'interpréter ces spectres nous avons choisit l'α octaacétate de cellobiose, car il présente deux protons bien séparés qui nous ont permis d'utiliser la technique de double inadiation.

Trois protons du cycle anomère A sont identifiables immédiatement :

- le doublet du proton 1A à 6,24 ppm (J = 3,5 Hz) seul doublet où J est faible,

- le quadruplet du proton 2A à 5 ppm (J_{12} = 3, 5 Hz ; J_{23} = 8, 5 Hz) seul quadruplet où figure un petit couplage,
- le triplet du proton 4A à 3, 78 ppm (J = 9 Hz) (seul protons possédant deux grands couplages n'ayant pas d'acétate en α et qui correspond donc au triplet le moins déplacé).

L'identification des autres protons est plus complexe, de nombreux couplages diaxiaux voisins rendant l'attribution des triplets assez ambigue. On a donc eu recours à des expériences de double résonance : l'irradiation du triplet situé à 5, 42 ppm rassemble les raies du proton 4A à 3, 78 ppm (figure 8a), ces deux protons sont donc couplés entre eux, le triplet à 5, 42 ppm est le proton 3A.

Les protons 5A et 5B forment la partie X du système ABX constitué par les trois protons 5, 6 et 6', chaque raie de cette partie X étant elle-même dédoublée par le couplage avec le proton 4. Ces protons sortent donc sous la forme d'un octet assez mal résolu dont l'un est à

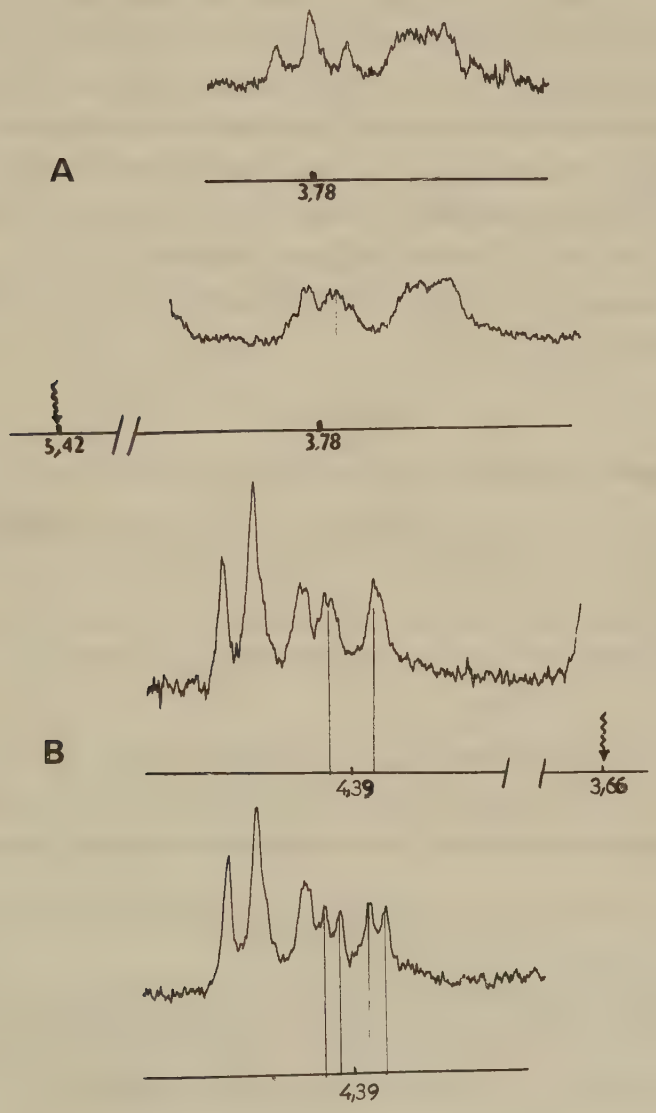


Figure 8 - Expériences de double irradiation à 250 MHz.

3, 66 ppm et l'autre à 3, 98 ppm. Le proton 4A ne peut pas être couplé avec le proton situé à 3, 66 ppm car il présenterait alors un fort effet du second ordre sur la droite. Il est donc couplé au proton à 3, 98 ppm qui est le proton 5A. Le proton à 3, 66 ppm est par conséquent le proton 5B.

Les protons 6 et 6' constituent la partie AB du système ABX précédent. Cette partie AB sort sous forme de huit raies, avec $J_{AB} = J_{6\,6'} = 12$ Hz ; $J_{AX} = J_{6\,5} = 4,25$ Hz pour l'un, et $J_{BX} = J_{6'\,5} = 1,75$ Hz pour l'autre.

Par irradiation du proton 5B, à 3, 66 ppm, le couplage $J_{5B-6B'}$ doit disparaître ; on constate par une telle irradiation (figure 8B) le rassemblement des raies du proton à 4, 39 ppm (grand couplage) : ce quadruplet est donc celui du proton 6B. Le quadruplet à 4, 46 ppm (petit couplage) est alors le proton 6A, tandis que les quadruplets à 4, 1 ppm (grand couplage) et 4 ppm (petit couplage) sont respectivement les protons 6'A et 6'B.

Tous les protons du cycle anomère sont donc attribués.

En ce qui concerne les protons du cycle terminal B, le proton 1B est le seul sortant sous forme de doublet ($J_{12} = 8$ Hz) à 4, 49 ppm. Il reste les trois protons portant des groupes acétates secondaires, 2B, 3B, 4B qui sortent sous forme de triplets à 5, 14 (J = 8, 75 Hz) , 5, 06 (J = 9, 5 Hz), et 4, 93 ppm (J = 8, 75 Hz) les deux raies latérales du quadruplet du proton 2A se superposant aux raies latérales des triplets à 5, 06 ppm et à 4, 93 ppm.

La première constatation que l'on peut faire est que le proton 2B, couplé à 1B, avec une constante $J_{12} = 8$ Hz, ne peut pas être le triplet à 5, 06 ppm, dont la constante de couplage unique est de 9, 5 Hz, car alors on devrait avoir un quadruplet.

Si l'on élimine cette solution, il ne reste pour les trois triplets que les possibilités indiquées dans le tableau I.

TABLEAU I

Les quatre hypothèses initiales pour l'attribution des triplets à 4, 93 , 5, 06 et 5, 14 ppm

δ ppm / Possibilités	5, 14	5, 06	4, 93
1	2 B	4 B	3 B
2	2 B	3 B	4 B
3	4 B	3 B	2 B
4	3 B	4 B	2 B

On peut traiter le système de ces trois protons comme un système ABCMX, où M est le proton 1B à 4, 49 ppm ($J_{1B-2B} = 8$ Hz).

Nous avons fait calculer les sous-spectres correspondants sur programme LAOCOON III en gardant au cours des itérations les déplacements chimiques de 1B et 5B, ainsi que la constante de couplage J_{1B-2B} constants. Les deux premières possibilités sont facilement exclues, mais le troisième et le quatrième cas donnent des spectres très voisins : la comparaison des spectres théoriques et du spectre expérimental est donnée par la figure 9.

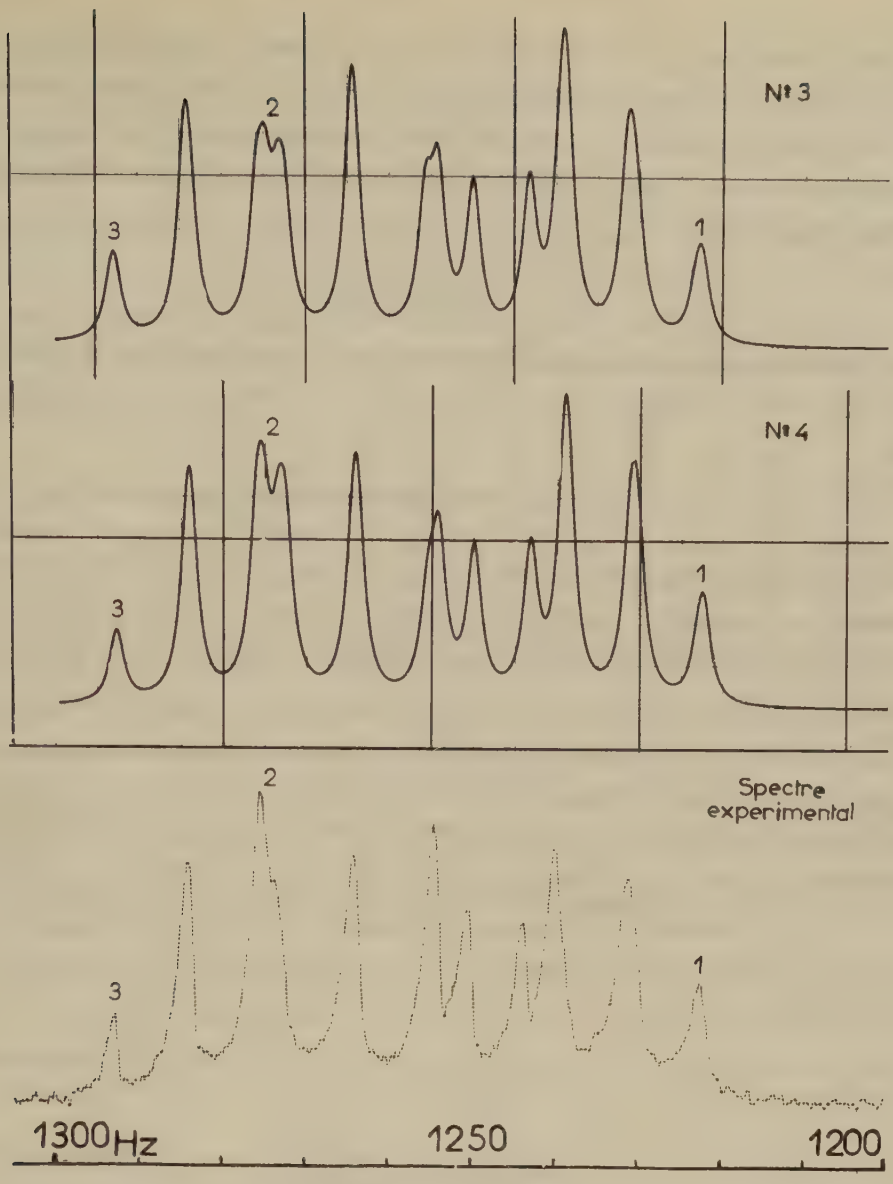


Figure 9 - Comparaison du spectre expérimental et des spectres calculés.

Le choix entre ces deux solutions 3 et 4 a été effectué en comparant, d'une part les rapports des intensités des raies 1 et 3, d'autre part l'intensité de la raie 2 sur les deux spectres calculés et sur le spectre expérimental. Cette comparaison est indiquée dans le tableau II.

TABLEAU II

Les deux critères utilisés pour choisir entre les deux possibilités restantes

	Spectre n° 3	Spectre n° 4	Spectre expérimental
I_1 / I_3	1,3	1,8	2
I_2	5,85	7,5	7,1

Nous voyons que, compte tenu de ces deux critères, le spectre obtenu dans la disposition n° 4 est plus proche du spectre expérimental, et cette attribution a été choisie.

L'attribution complète des 14 protons de l'α-octaacétate de cellobiose figure sur la portion du spectre agrandi de la figure 10. Les valeurs des déplacements et des couplages sont rassemblés dans le tableau III.

TABLEAU III

Résultats sur les déplacements chimiques et les constantes de couplage

Déplacements chimiques (ppm)	δ_1	δ_2	δ_3	δ_4	δ_5	δ_6	$\delta_{6'}$
Cycle anomère A	6,24	5	5,42	3,78	3,98	4,46	4,1
Cycle terminal B	4,49	4,93	5,14	5,06	3,66	4,39	4,04
Constantes de couplage (Hz)	J_{12}	J_{23}	J_{34}	J_{45}	J_{56}	$J_{56'}$	
Cycle anomère A	3,5	8,5	9	9	1,75	4,25	
Cycle terminal B	8	9,1	8,8	9,5	4,25	1,75	

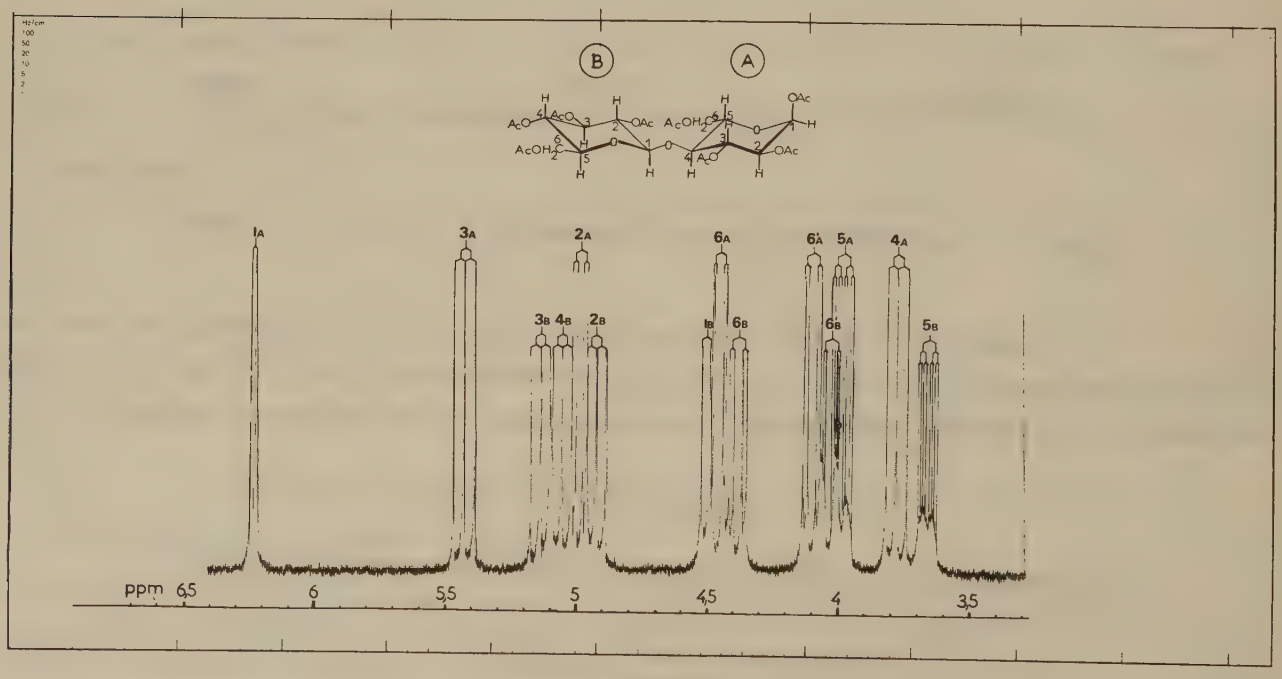


Figure 10 - Attribution des protons du cycle de l'α-octaacétate de cellobiose à 250 MHz.

- Discussion

Trois faits principaux méritent d'être signalés :

- le croisement de la disposition relative au déplacement chimique des protons 6 et 6' couplés fortement et faiblement aux protons 5 quand on passe du cycle anomère A au cycle terminal B,
- l'attribution complète des 14 protons permet d'aborder la détermination du taux de deutériation sur chaque position des deux cycles. De telles études sont en cours au laboratoire mais ont été jusqu'ici limitées au glucose [7].

2 - Extrémité de chaînes des polysaccharides dérivés du glucose

De l'étude de l'évolution des spectres entre les acétates de glucose et les acétates de cellobiose ou de maltose, nous en avons déduit que le doublet de l'extrémité anomère ne change pas de déplacement chimique, lorsqu'on passe de une unité à deux unités glucose, ce fait a été vérifié par ailleurs sur la série des oligosaccharides de la cellulose, allant jusqu'à cinq unités [6].

Il existe une relation, entre le rapport des intensités du doublet anomère et de la totalité des protons, et le degré de condensation n des aligosaccharides. Un oligomère de degré de condensation n aura 7n protons de cycle, le rapport entre le doublet anomère et la totalité des protons sera de $1/7n$. Par intégration de ces différents protons il est possible de déterminer le degré de polymérisation moyen d'un acétate d'oligosaccharide inconnu.

En extrapolant ces résultats pour les polymères correspondants, on peut s'attendre à ce qu'il existe un proton de l'extrémité anomère résonnant à champ plus faible que la totalité des 7n protons des cycles glucose.

- Triacétate de cellulose

Le spectre représentant l'agrandissement des protons du cycle du triacétate de cellulose donné par les figures précédentes, bien qu'ils aient été obtenus après stockage des informations pendant trente passages dans un analyseur multicanaux, ne montre aucune présence de doublets anomériques α ou β . En restreignant la plage balayée, de manière à ne pas trop augmenter le temps du stockage et en utilisant un correcteur automatique d'origine, nous avons pu balayer 1 030 fois la région comprise entre 650 et 450 cps. La figure 11 montre le spectre obtenu en utilisant deux échelles de sortie différentes de la chaîne de stockage. On y voit apparaître deux doublets ; il apparaît également un triplet dans la queue de raie du massif des protons H_3 . Ces signaux sont centrés à 6,24 ppm (J = 3,5 Hz), 5,63 ppm (J = 7 Hz) et 5,40 ppm (triplet, J = 9 Hz).

Le doublet à 6,24 ppm représente le proton anomérique des extrémités de chaîne sous forme α ; celui à 5,63 ppm représente les extrémités de chaîne sous forme β . Le triplet à 5,40 ppm est dû au proton 3 de l'extrémité anomère. Il correspond en fait au proton H_3 des extrémités anomères de chaînes sous forme α , par analogie à l'α pentaacétate de glucose et l'α octaacétate de cellobiose.

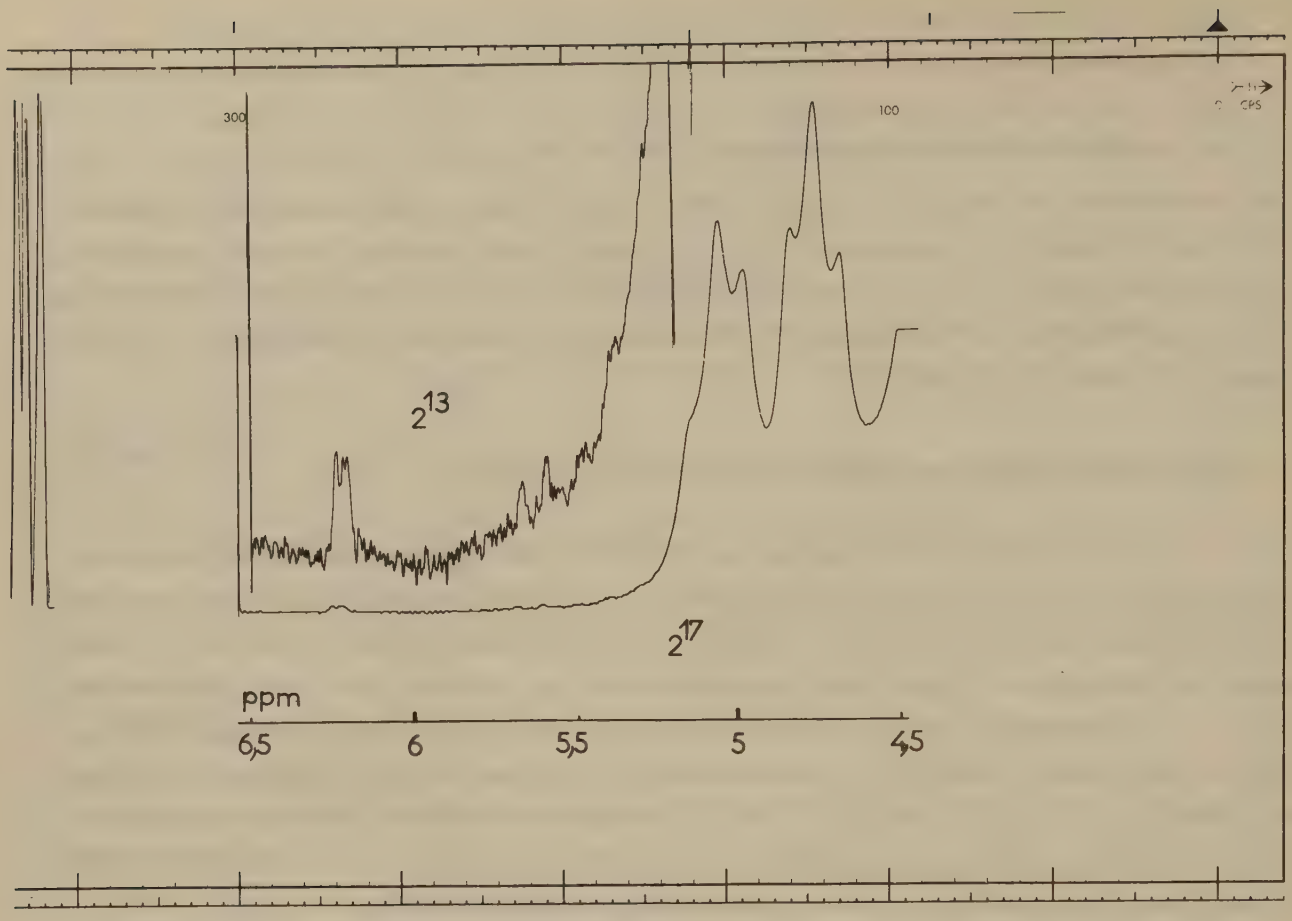


Figure 11 - Extrémités de chaînes α et β du triacétate de cellulose (1 000 passages).

Le rapport des intensités de ces deux doublets indique que 70 °/₀ (± 5 °/₀) des extrémités de chaînes sont sous forme α alors que 30 °/₀ sont sous forme β . Ceci est évidemment valable pour l'échantillon étudié, où le triacétate a été obtenu par acétylation de la cellulose au chlorure d'acétyle. Cette méthode peut donc être appliquée pour déterminer la conformation des extrémités de chaînes, de même que pour étudier la conformation d'autres dérivés cellulosiques solubles.

Pour illustrer cette possibilité nous avons effectué le spectre d'un échantillon de triacétate préparé, en partant d'acétate de cellulose et en péracétylant dans le milieu anhydride acétique-pyridine. Le spectre obtenu en effectuant 500 passages sur la région 4, 5 et 6, 5 ppm (figure 12) montre que l'extrémités anomère est essentiellement sous forme α .

L'extrémité anomère des polysaccharides peut être réduite par ouverture du cycle anomère et transformation de la fonction aldéhyde en fonction alcool secondaire.

L'acétylation d'un produit traité de cette manière doit faire disparaître dans le spectre R.M.N. les trois protons résonnant à 6, 24 , 5, 63 et 5, 40 ppm.

La figure 13 montre le spectre obtenu du triacétate à extrémité réduite. Cet échantillon a été préparé par réduction à $NaBH_4$, puis après réduction de cellulose régénérée (cellulose plus réactive) péracétylation dans le milieu acide acétique-anhydride acétique-acide perchlorique.

On note sur ce spectre la disparition des protons d'extrémité de chaîne.

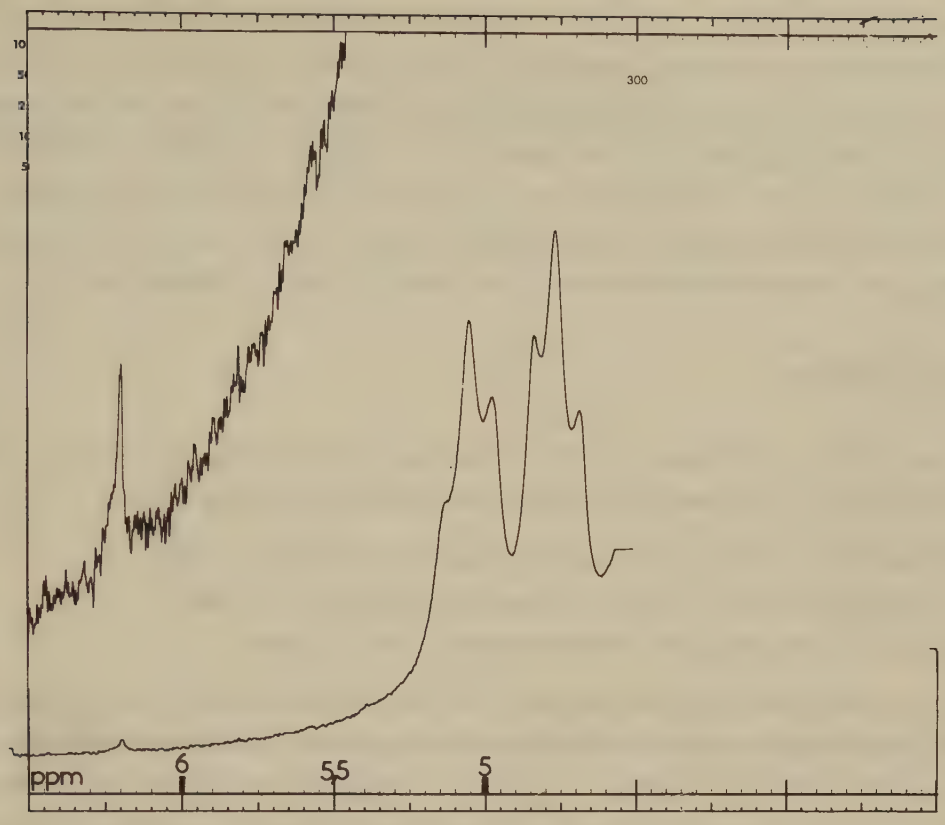


Figure 12 - Extrémité de chaîne α du triacétate de cellulose (500 passages).

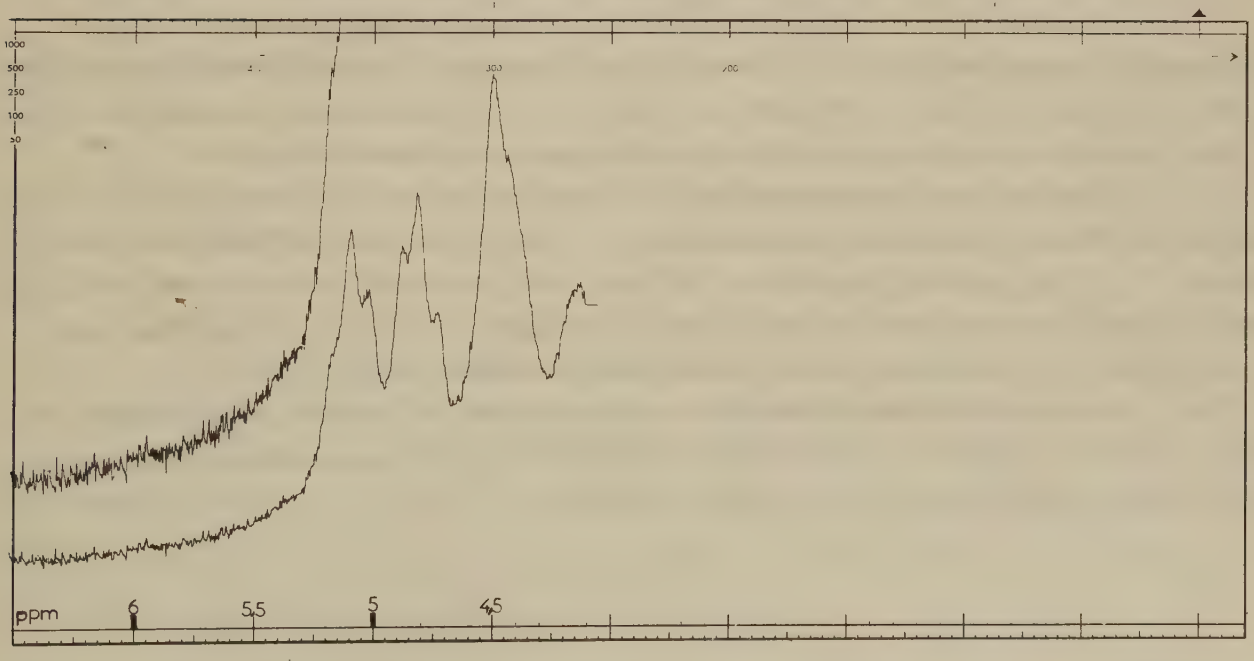


Figure 13 - Extrémité de chaîne de la cellulose réduite (500 passages).

Nous avons vu que le rapport du doublet à la totalité des protons est égal à 1/7n dans un acétate d'oligosaccharide, où n est le degré de polymérisation. Ce spectre permet donc en principe de déterminer le degré de polymérisation en nombre par mesure des aires des deux triplets, par rapport à celle des autres protons du cycle. Cette mesure est délicate compte tenu du bruit résiduel, et de la grande valeur du nombre 7n. Elle donne cependant un degré de polymérisation moyen de n = 180, en désaccord avec la valeur déterminée de façon classique (n = 80 à 90). Les causes de cette divergence n'ont pas été analysées pour le moment. Elle suggère cependant l'existence d'extrémités différentes d'une unité glucose acétylée (α ou β).

- Triacétate d'amylose

Les dérivés modèles du triacétate d'amylose, pentaacétate de glucose et octaacétate de maltose, présentent un déplacement chimique spécifique du proton anomère :

- 6,28 pour pentaacétyle α D glucopyranose (figure 1a) (J = 3,5 Hz)
- 5,72 pour pentaacétyle β D glucopyranose (figure 1b) (J = 7 Hz)
- 5,75 pour β octaacétate de maltose (figure 4) (J = 7,5 Hz).

Il n'existe aucune méthode donnant l'α octaacétate de maltose. Nous avons essayé de la préparer dans le mélange anhydride acétique-pyridine qui donne préférentiellement la forme α. Le spectre du produit obtenu est identique à celui de la forme β, bien que le point de fusion soit plus faible. ($F_{140-141}$). Le spectre obtenu en effectuant une vingtaine de passages montre l'apparition d'un doublet à 6,15 ppm d'écart J = 3,75 Hz, qui correspond à la forme α. Celle-ci représente 3 °/₀ du total, ce qui explique qu'elle ne soit pas visible sur le spectre normal.

D'après les spectres de ces modèles on peut s'attendre à ce que, par analogie avec le triacétate de cellulose, l'extrémité anomère du triacétate d'amylose soit différente en R.M.N.

Le triacétate d'amylose a été préparé par acétylation d'amylose (SIGMA) dans le mélange pyridine-anhydride acétique, péracétylé dans le milieu acide acétique-anhydride acétique-acide perchlorique. Le spectre est donné par la figure 14 et se décompose en deux massifs : vers 2 ppm, les trois pics acétates, entre 3,5 et 5,5 ppm les sept protons du cycle.

Les spectres superposés entre 5 et 6,5 ppm ont été obtenus par accumulation de spectres en effectuant 500 passages environ (CAT). On note la présence à 6,2 ppm d'un doublet d'écart J = 3,5 Hz, que l'on peut attribuer à la forme α de l'extrémité de chaîne alors que la forme β, que l'on pourrait attendre à 5,75 ppm par analogie avec le β pentaacétate de glucose et le β octaacétate de maltose n'est pas visible, donc inférieure à 5 °/₀.

La méthode d'acétylation utilisée, pyridine-anhydride acétique donne préférentiellement la forme α, comme nous l'avons également constaté avec le triacétate de cellulose, alors qu'elle donne essentiellement la forme β sur le maltose.

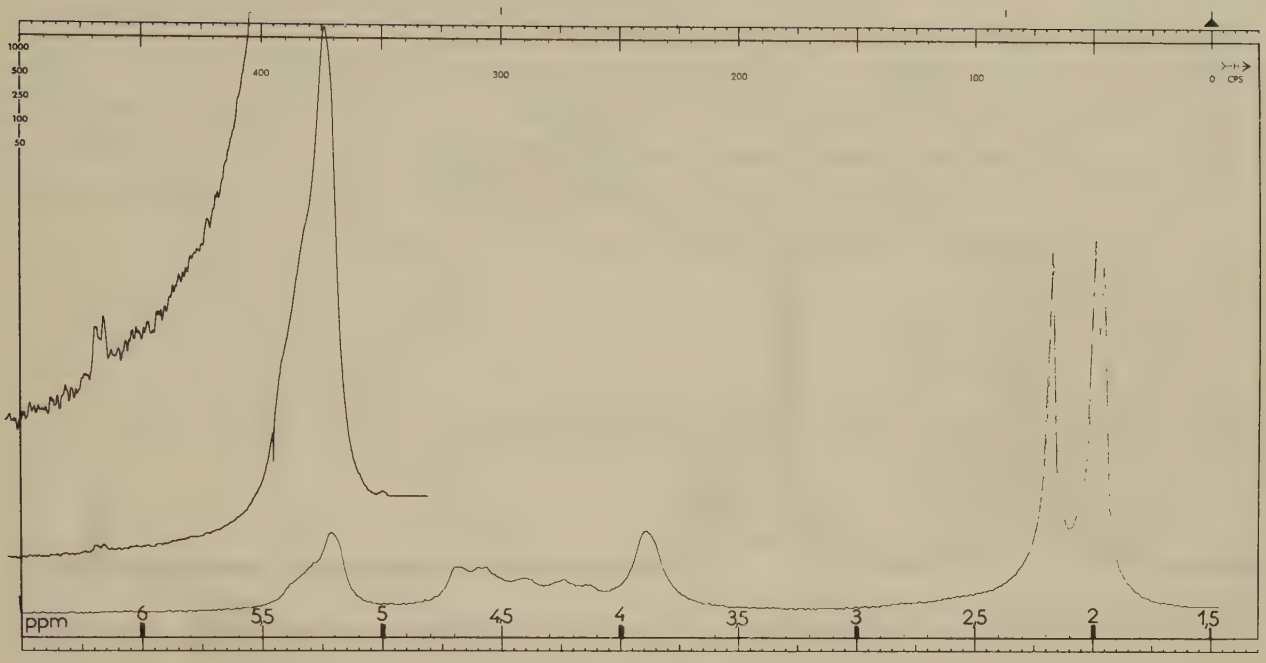


Figure 14 - Extrémités de chaînes du triacétate d'amylose (500 passages).

- Nitro cellulose

Le β-penta-nitrate de glucose présente dans l'acétone deutériée (figure 15) un spectre dont les protons sont très déplacés, en particulier le proton anomère sous forme de doublet à 6,48 ppm (J = 8 Hz).

La nitrocellulose étudiée a été obtenue par nitration de linters de coton dans le mélange acide nitrique-acide acétique-anhydride acétique. Son degré de substitution est de 2,9 , déterminé par dosage du taux d'azote, son DP déterminé par viscosité dans le tétrahydrofurane est de 250.

Le spectre de R.M.N. effectué dans l'acétone deutériée est présenté sur la figure 16.

Les sept protons du cycle sont compris entre 3,5 et 6 ppm, le pic à 3,3 ppm est dû à une impureté, on le retrouve dans tous les corps utilisés comme modèle, glucose, cellobiose. Le pic à 2,7 ppm est dû aux OH restants, non nitrés. Les spectres superposés entre 5,5 et 7 ppm ont été obtenus par la technique d'accumulation de spectre en effectuant 500 passages. On note sur ces agrandissements un doublet α à 6,84 ppm (J = 4,5 Hz), un doublet β à 6,5 ppm (J = 8,5 Hz), enfin un triplet à 6,08 ppm (J = 9 Hz).

On peut doser quantitativement à 5 °/₀ près l'importance des extrémités α et β de la chaîne, on trouve 40 °/₀ de forme α et 60 °/₀ de forme β , données par le milieu de nitration utilisé.

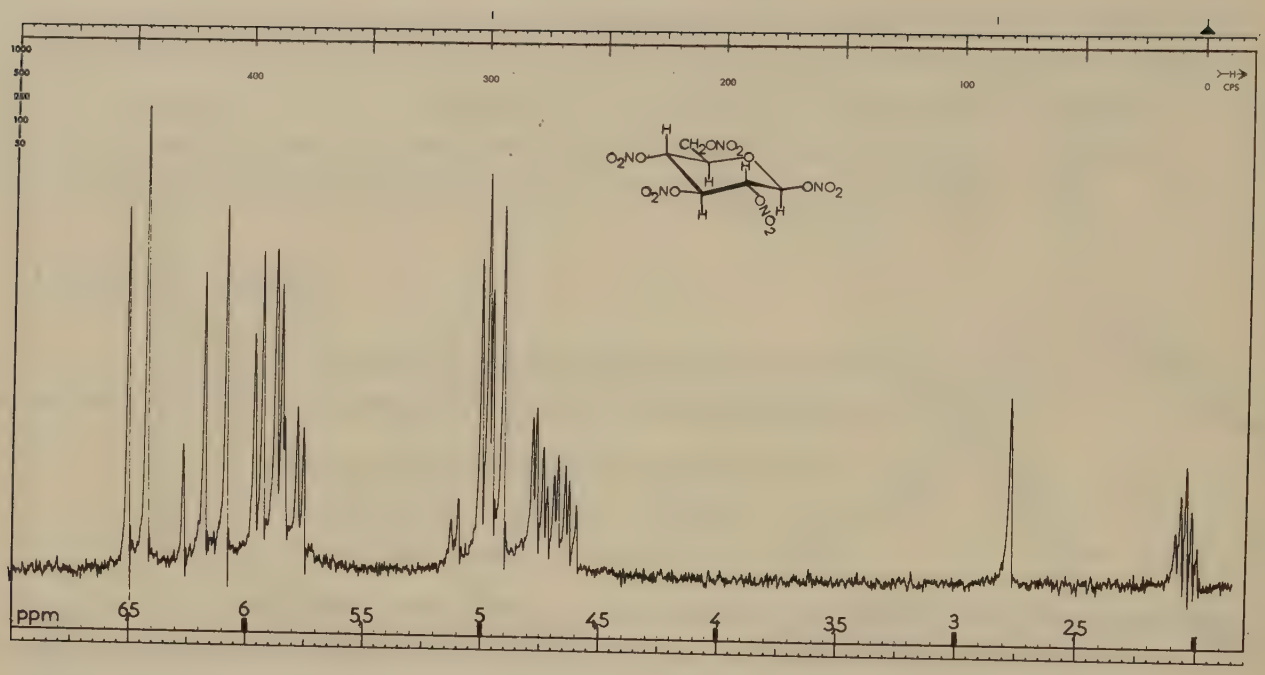


Figure 15 - Spectre du penta nitrate de β D-glucopyranose à 100 MHz.

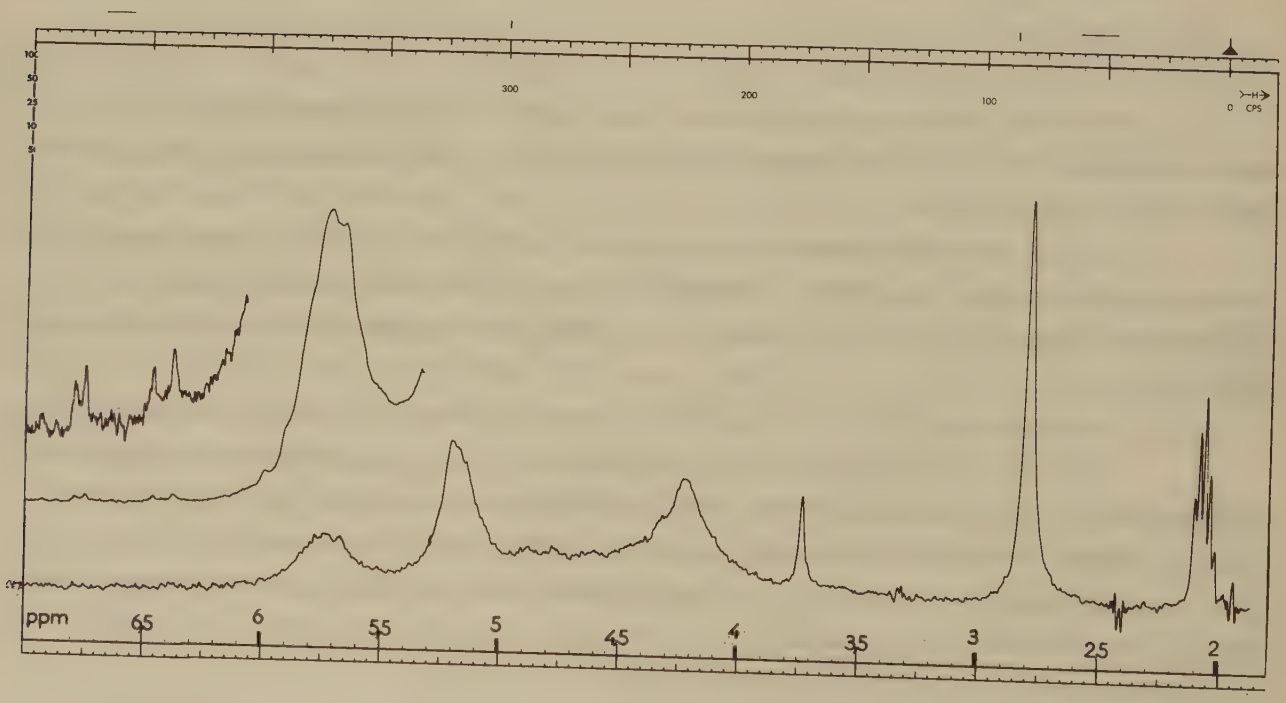


Figure 16 - Extrémités de chaînes de nitro-cellulose (500 passages).

- Acétate de cellulose

Les acétates de cellulose étudiés avaient un Ds compris entre 2,2 et 2,4 et étaient solubles dans l'acétone.

Ces dérivés sont obtenus à partir du triacétate, par hydrolyse des groupes acétates en milieu acide dilué. En général, on ajoute directement au bain d'acétylation, constitué d'acide acétique et d'acide sulfurique, une certaine quantité d'eau. En contrôlant périodiquement l'hydrolyse, on obtient les acétates solubles dans l'acétone, dont le DS est compris entre 2,2 et 2,5.

Le spectre présenté sur la figure 17 a été effectué dans l'acétone deutériée.

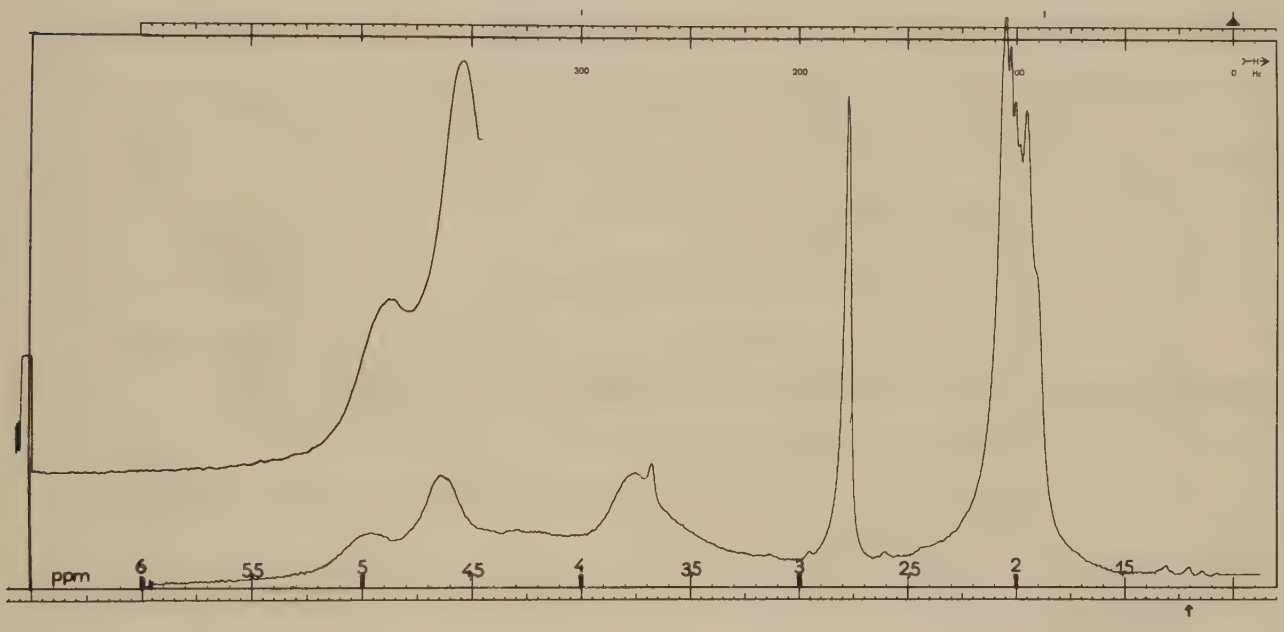


Figure 17 - Extrémité de chaîne d'acétate de cellulose (500 passages).

Les spectres superposés entre 4,5 et 6,5 ppm ont été obtenus par la technique d'accumulation de spectre en effectuant 500 passages, avec deux intensités de sortie différentes.

On voit immédiatement qu'aucun signal dû aux protons anomères d'extrémité de chaîne n'est visible entre 5,75 et 6,2 ppm, déplacements où se trouvent les protons β et α dans le triacétate de cellulose. Ceci montre que le OH de la position anomère n'est pas substitué par un groupe acétate, mais se trouve sous forme de OH libre, le proton H_1 ayant alors un déplacement chimique inférieur et se trouvant sous le massif des protons du cycle.

Le fait que nous trouvions ce résultat pour des acétates de cellulose d'origine différente, démontre que lors de l'hydrolyse du triacétate pour rétrograder le taux d'acétylation,

l'extrémité anomère de la chaîne réagit d'abord. Ce fait n'est pas étonnant dans la mesure où la plus grande réactivité de cette position dans les sucres est connue.

3 - Réactivité de l'extrémité de chaîne du triacétate de cellulose

- Tertiobutyl triacétate de cellulose

On connaît la possibilité de synthétiser, à partir d'un peracétate de sucre, le β-t-butyl glycoside correspondant, par l'intermédiaire de l'α- bromoacétate, en particulier pour le glucose [9].

Nous avons essayé d'étendre cette méthode à l'octaacétate de cellobiose d'une part, et au triacétate de cellulose d'autre part. Nous avons tout d'abord utilisé la méthode de LINDBERG [9] : acétobromo glucose, acétate mercurique, soit en phase hétérogène dans t-butanol anhydre, soit en solution dans le mélange t-butanol-chlorure de méthylène. Nous avons obtenu comme l'auteur, le tétra acétyl-t-butyl β-D-glucopyranoside avec un bon rendement.

La même méthode appliquée à l'acétobromocellobiose donne un mélange de trois corps :

- β-t-butyl hepta acétyl cellobioside
- β-octaacétate de cellobiose
- hepta acétyl 2-3-6-2'-3'-4'-6' cellobiose.

En utilisant la méthode de VEIBEL [8], acéto-bromocellobiose dans le t-butanol anhydre en présence de carbonate d'argent à l'ébullition, on obtient deux corps :

- β-t-butyl hepta acétyl cellobioside
- heptaacétyl 2-3-6-2'-3'-4'-6' cellobiose en proportions variables suivant le temps de réaction.

Temps de réaction (minutes)	5	10	30
°/₀ t Bu cellobioside	100	90	66

Nous avons donc utilisé cette deuxième méthode pour le triacétate de cellulose.

Le bromo triacétate de cellulose est obtenu par la méthode classique d'obtention des dérivés bromés des mono et disaccharides. Le triacétate de cellulose est versé dans le mélange d'acide acétique contenant 40 °/₀ de HBr, la solution étant maintenue à 0°C. La dissolution a lieu en 30 minutes. Le bromo triacétate isolé, est ensuite traité comme le bromo acétate de cellobiose, dans le t-butanol anhydre à l'ébullition en présence de Ag_2CO_3.

- Caractérisation des produits et spectres de R.M.N.

Le tétraacétyl 2-3-4-6-t-butyl-β-D-glucopyranoside obtenu par l'une des deux méthodes utilisées présente un point de fusion de 141-143°C. Son spectre de R.M.N. est donné par la figure 18. Nous voyons sur ce spectre que le proton anomère H_{1a} se trouve à 4,63 ppm moins déplacé que les protons H_3 , H_4 , H_2 qui sont en α d'un groupe ester.

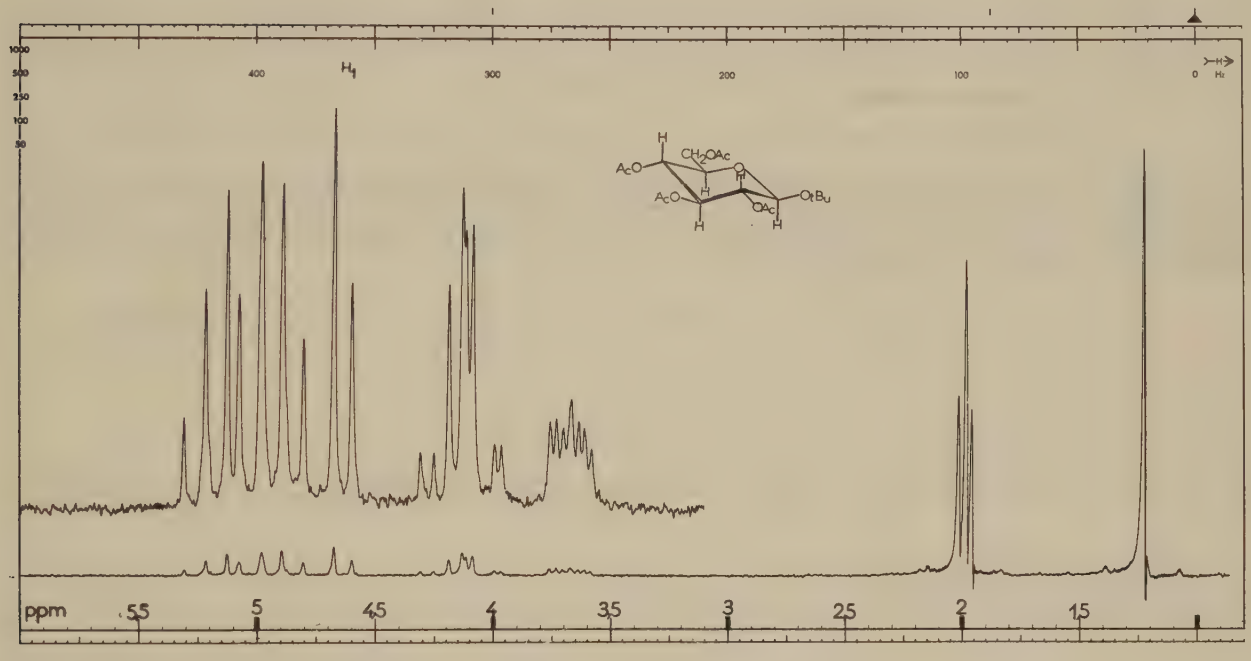


Figure 18 - Spectre du tétraacétyl 2-3-4-6-t-Bu β-D-glucopyranoside à 100 MHz.

Dans le cas du cellobiose, les produits de la réaction sont identifiés en chromatographie sur couche mince de silice, en utilisant le mélange cyclohexane 40 °/₀ - acétate d'éthyle 60 °/₀, puis ils sont séparés sur colonne de silice.

- Le β-octaacétate de cellobiose a été identifié par son point de fusion, son Rf et son spectre de R.M.N.

- L'heptaacétyl 2-3-6-2'-3'-4'-6'- cellobiose a été caractérisé par acétylation de ce produit dans le mélange anhydride acétique deutérié-pyridine. Par comparaison du spectre de R.M.N. avec celui de l'octaacétate de cellobiose, on obtient un corps ayant sept groupes acétates pour 14 protons de cycle. En comparant les pics acétates dans $CDCl_3$, suivant la méthode de HORTON [10] on s'aperçoit que le pic acétate anomère, le plus déplacé [11, 12] a disparu

(une expérience analogue sur le glucose nous a indiqué de la même manière que la fonction OH libre étant en position I on obtient le pentaacétyl α-D-glucopyranose).

- Le β-t-butyl heptaacétyl cellobioside a un point de fusion de 206-208°C. Son analyse élémentaire correspond à la formule théorique, son spectre de R. M. N. donné par la figure 19 satisfait à la formule : un pic t-butyl représentant 9 protons à 1, 2 ppm, 7 pics acétates vers 2 ppm pour 14 protons entre 3, 5 et 5, 5 ppm. Comme pour le t-Butyl glucoside, le doublet du proton anomère est moins déplacé que les protons du cycle qui sont substitués par un groupe acétate.

Le bromotriacétate de cellulose est un produit dont l'aspect est identique au triacétate de départ. Il est instable à température ambiante, il se produit un dégagement d'acide acétique ; cependant il peut être conservé quelques semaines en frigidaire. Les mesures de viscosité effectuées sur ce produit montrent que le triacétate de départ (DP = 120) a été fortement dégradé. Avant de caractériser ce produit par son spectre de R. M. N., nous avons étudié ceux du trétra-acétyl-α-D-bromo glucopyranoside (figure 20) et de l'hepta acétyl-α-D-bromo cellobioside.

Nous voyons sur ces spectres que le doublet anomère à 6, 53 ppm est bien sous forme α (J = 4 Hz), le déplacement produit par le brome étant plus important que celui dû à un acétate. Aussi bien dans le cas du glucose que dans le cas du cellobiose, le proton H_3 est plus déplacé que les autres à 5, 55 ppm (J = 10 Hz).

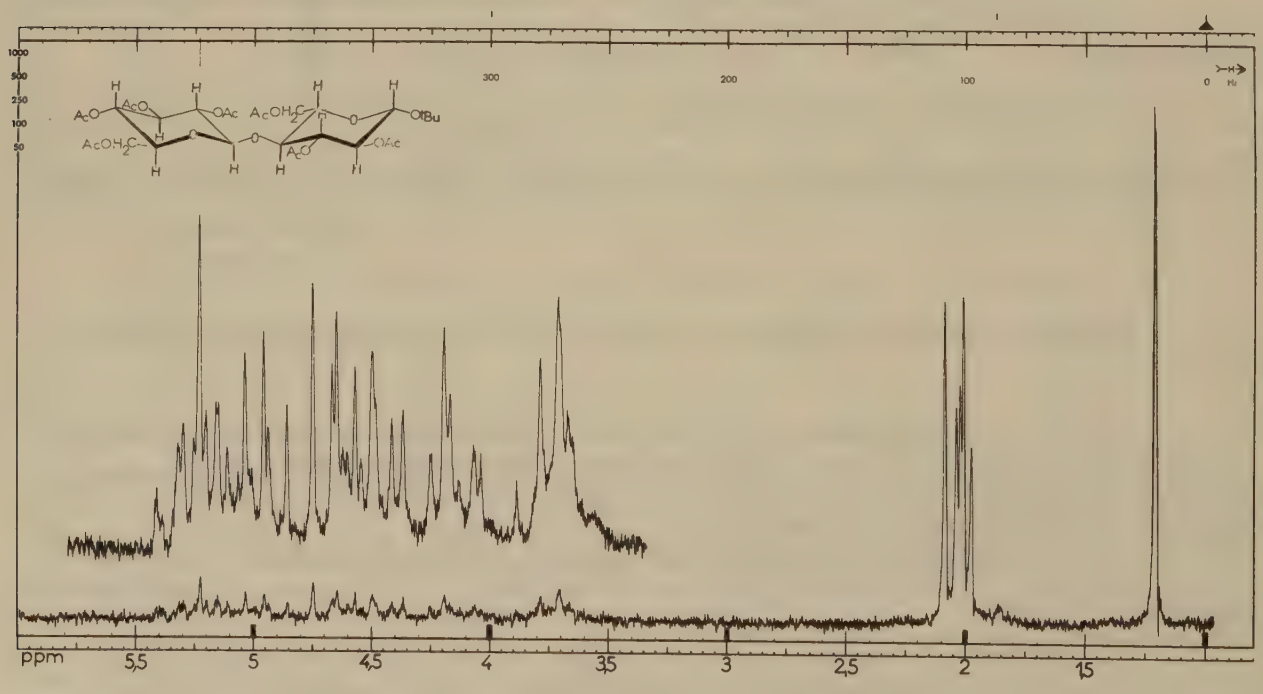


Figure 19 - Spectre de l'heptaacétyl-t-Bu β-D-cellobioside à 100 MHz.

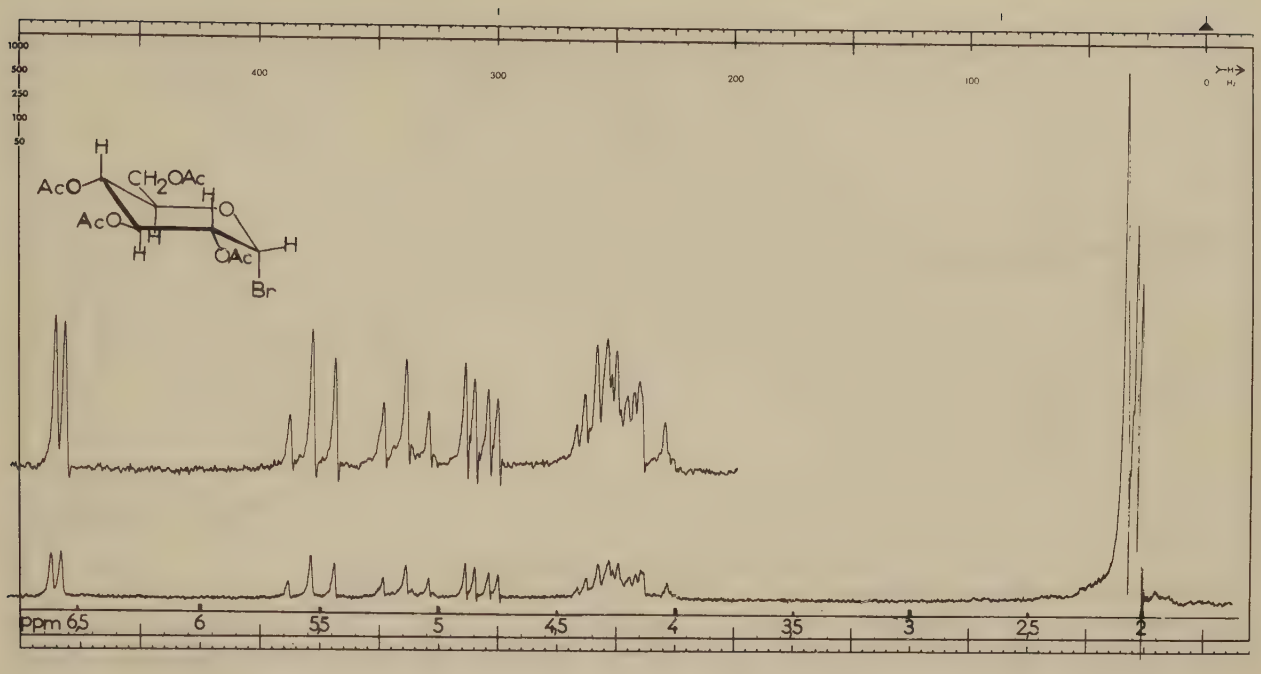


Figure 20 - Spectre du tétra acétyl 2-3-4-6 Bromo α D-glucopyranoside à 100 MHz.

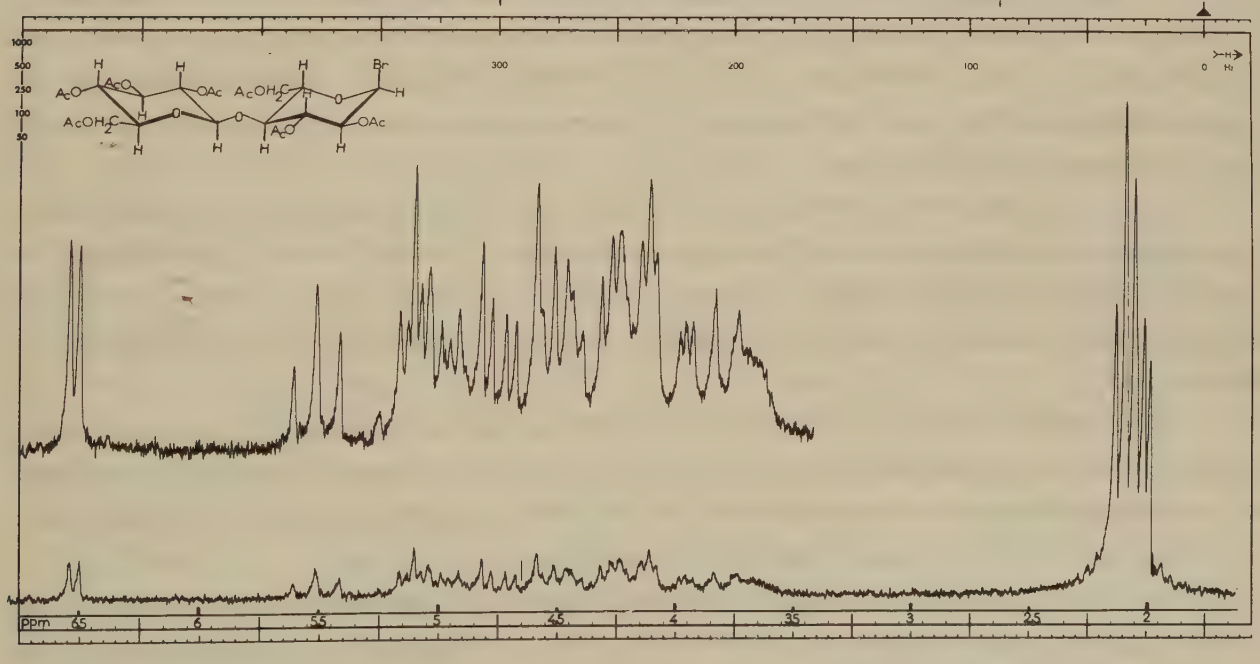


Figure 21 - Spectre de l'hepta acétyl bromo-α D-cellobioside à 100 MHz.

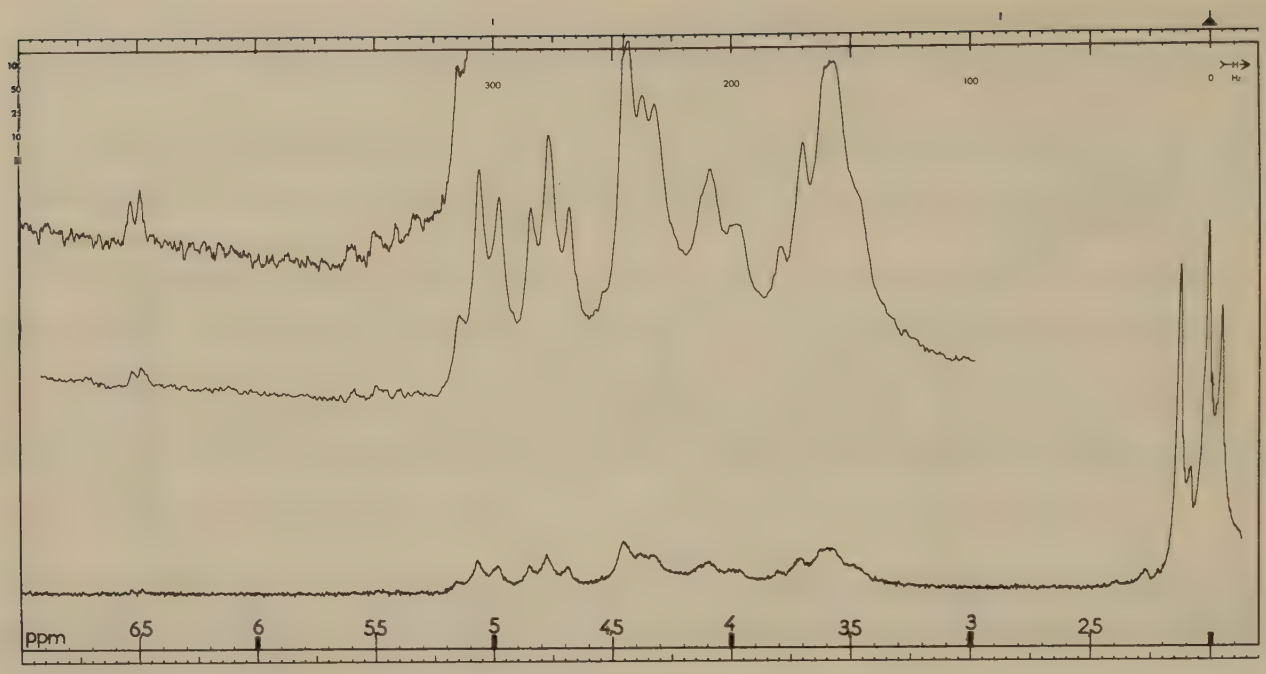


Figure 22 - Spectre de l'acéto bromocellulose à 100 MHz (100 passages).

La figure 22 montre le spectre du bromotriacétate de cellulose, avec l'agrandissement de la partie comprise entre 4, 5 et 7 ppm. Le spectre par lui-même ressemble à celui du triacétate de cellulose assez dégradé. L'agrandissement du spectre montre un doublet sous forme α à 6, 5 ppm (J = 4 Hz), et un triplet à 5, 5 ppm (J = 10 Hz). Ce spectre indique clairement que le brome a réagi sur le triacétate de cellulose de la même manière que sur le pentaacétate de glucose ou l'octaacétate de cellobiose.

Nous avons voulu vérifier que l'α-bromotriacétate de cellulose se comportait de la même manière que le tétraacétyl α-D bromoglucopyranoside ou l'hepta acétyl α-D-bromocellobioside vis-à-vis de l'acide acétique en présence d'acétate mercurique. On connaît en effet la possibilité de synthèse de β-octaacétate de cellobiose à partir de l'hepta acétyl α-D-bromocellobioside.

Nous avons fait réagir le bromotriacétate de cellulose pendant une heure dans l'acide acétique à froid en présence d'acétate mercurique, le produit obtenu donne le spectre de la figure 23, dont l'agrandissement de la partie située entre 4, 5 et 6, 5 ppm montre la présence du doublet à 5, 75 ppm avec J = 8 Hz, caractéristique d'un acétate β.

Le tertiobutyle triacétate de cellulose a été obtenu en faisant réagir le bromo triacétate dans le tertiobutanol anhydre en présence de Ag_2CO_3 à l'ébullition, pendant des temps variables allant de 1/4 d'heure à 1 h 1/2. En fin de réaction, on ajoute du chloroforme pour solubiliser

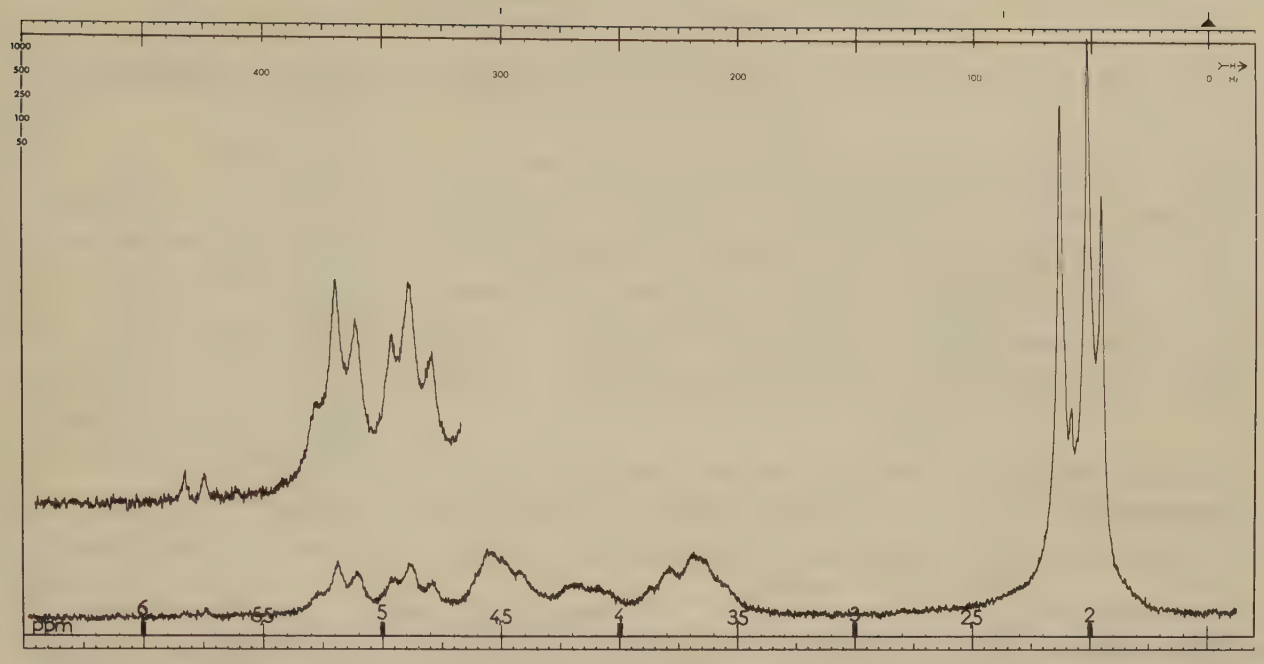


Figure 23 - Spectre des extrémités de chaînes β du triacétate de cellulose à 100 MHz (100 passages).

le polymère et on filtre pour éliminer les sels d'argent. Le spectre de la figure 24 montre le produit obtenu après 30 mintes de réaction ; il est pratiquement identique à celui du triacétate de cellulose, avec en plus un signal assez fin vers 1,2 ppm, caractéristique du pic tertiobutyle. Ce pic est visible en effectuant un seul passage, car l'intensité du pic tertiobutyle étant de 9 protons, la sensibilité est nettement augmentée. D'autre part, la résonance de ce pic se produit à un déplacement chimique nettement séparé des autres signaux du triacétate. Par agrandissement de la région comprise entre 4,5 et 6,5 ppm, nous avons vérifié que le doublet du bromotriacétate avait bien disparu. Lorsque nous avons effectué le spectre du produit directement après évaporation du t-Butanol, nous avons toujours trouvé un pic important à 1,25 ppm qui augmentait lorsqu'on introduisait du t-Butanol pur dans le tube. Ce pic ne disparaît pas lorsqu'on tire sous vide le polymère, la seule manière pour le faire disparaître est d'utiliser la technique de précipitation du polymère dans un non solvant, qui est un solvant du t-Butanol. Nous avons donc dissous le polymère dans un minimum de chloroforme et précipité dans de l'alcool à 95. Après trois opérations, tout le t-Butanol libre a disparu, seul reste le pic à 1,2 ppm.

Après trois opérations de dissolution-précipitation, nous avons conservé en général 80 °/₀ du polymère de départ, les 20 °/₀ restés en solution sont essentiellement des oligomères.

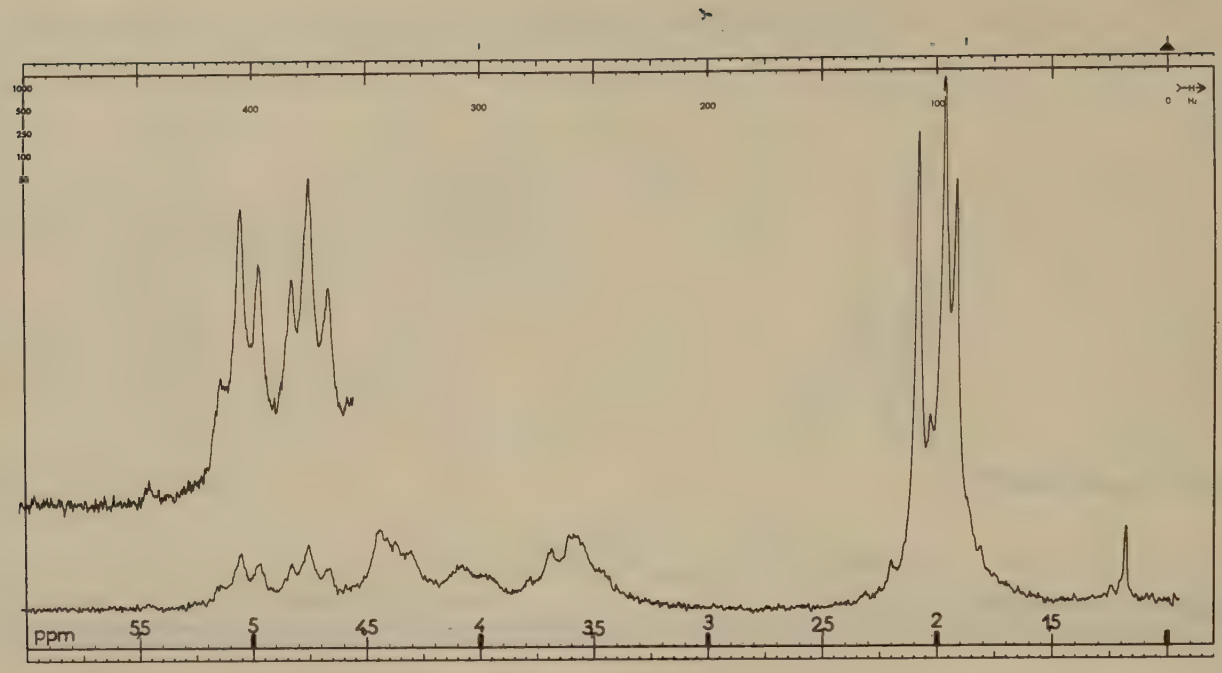


Figure 24 - Spectre du t-Butyl triacétate de cellulose à 100 MHz.

Le tableau ci-dessous indique, sur les différents essais que nous avons effectués, le calcul du DP_n du polymère en utilisant les neuf protons du groupe t-Butyle de l'extrémité de chaîne comme référence, par rapport aux 7n protons du cycle glucose si $DP_n = n$.

Temps de réaction (minutes)	5	15	30	60	90	240
Nombre de t-Butyle	0	1	1	1	1	-
DPn	-	45	42	52	56	-

Après cinq minutes de réaction, aucun groupe t-butyle n'est fixé sur le polymère, le temps de réaction est donc légèrement plus élevé que dans le cas du cellobiose, ce qui est normal en passant d'un corps simple à un polymère. Après 4 heures de réaction, on obtient un produit très peu soluble dans le chloroforme qui n'a pas été analysé. D'autre part, le DP calculé en comparant l'intensité du pic t-Butyle aux signaux des protons du cycle montre qu'il n'y a pas

comme dans le cas du cellobiose, élimination du groupe t-Butyle lorsqu'on augmente le temps de réaction, car le DP varierait de façon importante.

- Conclusion

Nous avons montré que dans les polysaccharides substitués, le proton d'extrémité de chaînes de ces polysaccharides était différent des autres et pouvait permettre de donner la forme anomérique de l'extrémité, et en particulier de suivre l'influence des réactifs dans les réactions d'estérification, de bromation et de débromohydratation. La substitution de l'atome de brome par un groupe t-Butyl permet de remplacer un proton d'extrémité anomère, par un groupe possédant neuf protons, ce qui permet d'éviter la technique d'accumulation de spectre et augmente la précision.

Lorsque la position anomère est substituée par un groupe éther, le déplacement chimique du proton anomère devient identique à ceux des autres protons du cycle, si bien que la substitution d'un groupe éther en bout de chaîne se traduit par la disparition du double d'extrémité anomère.

Il existe une grande stabilité du déplacement chimique du doublet anomère lorsqu'on passe du monomère au dimère puis au polymère quelque soit le substituant : acétate, éther, brome, nitrate.

Nous avons également montré que la réactivité de l'extrémité anomère des polysaccharides est plus élevée que celle des autres positions du cycle comme dans le cas des mono et oligosaccharides. Il est en particulier possible d'effectuer des synthèses du type Koenigs-Knorr sur des polysaccharides peracétylés.

PARTIE EXPERIMENTALE

1 - Triacétate de cellulose

a) Acétylation par le chlorure d'acétyle

On part de 150 mg d'acétate Prolabo (DS = 2,4), qui a été tiré sous vide à sec pendant 4 heures, en chauffant à 50°C.

On ajoute alors 1 cm^3 de CH_3COCl et 2 cm^3 de CH_3COOH. On ajoute une goutte de $HClO_4$ à 65 °/₀ lorsque l'acétate est passé en solution.

L'agitation est poursuivie pendant 16 heures à température ambiante. Le polymère est isolé par précipitation dans l'eau, lavage abondant à l'eau jusqu'à neutralisation, puis à l'alcool éthylique. On obtient 130 mg de triacétate après séchage sous vide.

b) Acétylation par l'anhydride acétique

On sèche 1,31 g d'acétate Prolabo comme précédemment et on leur ajoute 20 cm^3 de pyridine anhydre et 5 cm^3 anhydride acétique.

L'acétate passe en solution et la réaction est poursuivie pendant 11 jours à température ambiante jusqu'à gelification complète.

On ajoute 10 cm^3 d'acétone pour solubiliser le gel et on précipite la solution dans un excès de méthanol. Le triacétate est lavé à l'alcool puis séché. On obtient 1,53 g de triacétate.

2 - Triacétate à extrémité de chaîne réduite

a) Cellulose régénérée [13]

On part d'acétate Eastman-Kodak (39,8-3), 8,5 g mis en suspension dans 250 cm^3 d'une solution fraîchement préparée de CH_3ONa $\frac{M}{10}$.

L'agitation est poursuivie 2 heures à température ambiante.

La cellulose est filtrée, lavée à l'alcool méthylique, puis par une solution d'alcool méthylique 95 °/₀ et d'acide acétique 5 °/₀, à nouveau par l'alcool, puis séchée. On obtient 5,3 g de cellulose.

b) Réduction par $NaBH_4$ [14]

On met en suspension 1,0 g de cellulose régénérée dans 50 cm^3 d'une solution aqueuse, 0,2 M de $NaBH_4$. La réaction est poursuivie pendant 90 heures à température ambiante.

La cellulose est filtrée, lavée à l'eau, puis par une solution d'acide acétique à 5 °/₀ à nouveau à l'eau, et enfin à l'alcool. On obtient 0,61 g de cellulose après séchage.

c) Acétylation

Même méthode que 1a.

3 - Triacétate d'amylose

2 g d'amylose (Amylose SIGMA potatoe) sont chauffés à reflux dans l'alcool pendant une heure, puis séchés. On introduit alors l'amylose dans un mélange de 16 cm^3 de pyridine et 7 ml d'anhydride acétique en chauffant à 100°C pendant une nuit. Le produit passé en solution est précipité dans l'eau, lavé, séché. Il est repris dans un mélange de 40 cm^3 d'acide acétique, 5 cm^3 d'anhydride acétique et 0,5 cm^3 d'acide perchlorique. L'agitation est poursuivie pendant 30 minutes.

Le triacétate est isolé comme précédemment et est soluble dans le chloroforme.

4 - Nitrocellulose

1 g de linters de coton secs sont introduits dans un mélange d'acide nitrique fumant 43 °/₀, d'acide acétique 32 °/₀ et d'anhydride acétique 25 °/₀ maintenu à 0°C. La réaction s'effectue pendant 2 heures. Le produit est alors précipité dans l'eau glacée, filtré, lavé puis extrait au méthanol.

5 - Penta-nitro-glucose [15]

6 - Acétyl t-Butyl β-D-glucoside ou cellobioside

a) Méthode de Lindberg [9]

1,2 g d'acétobromoglucose (ou cellobiose) sont dissous dans 10 ml de CH_2Cl_2 secs ; on ajoute alors 10 ml de t-Butanol sec et 1 g d'acétate mercurique, on laisse agiter pendant une heure.

On lave alors la solution à l'eau (trois fois). La solution est alors séchée sur sulfate de sodium et évaporée ; on obtient 0,8 g de produit. Le produit est alors recristallisé dans l'alcool éthylique. F = 141-143°C.

b) Méthode de Veibel [8]

550 mg d'acétobromocellobiose sont mis en suspension dans 10 cm^3 de t-Butanol sec contenant 1,1 g de Ag_2CO_3 fraîchement préparé, et porté à l'ébullition pendant 5 minutes. On ajoute alors du chloroforme pour solubiliser le produit, les sels d'argent sont éliminés par filtration, et la solution obtenue évaporée sous vide. Après séchage et recristallisation dans l'alcool, celui-ci a un point de fusion de 206-208°C .

Microanalyse		C	H	O
$C_{30}H_{44}O_{18}$ = 692	Calculé	52,02	6,36	41,62
	Trouvé	52,01	6,45	41,59

7 - Bromotriacétate de cellulose [3]

1,1 g de triacétate de cellulose sont ajoutés à 30 cm^3 de solution d'acide acétique contenant 40 °/₀ de HBr (Merck) maintenue à 0°C avec agitation violente pendant 30 minutes.

La solution est filtrée sur verre fritté n° 2 dans 150 cm^3 de chloroforme. Le triacétate non dissous est ainsi éliminé. La solution chloroformique est extrait deux fois par l'eau glacée, lavée par une solution saturée de bicarbonate de sodium, puis à nouveau lavée par l'eau. La solution est alors séchée sur sulfate de sodium, puis évaporée sous vide en maintenant un bain entre 30 et 40°C.

On obtient 0,89 g de bromotriacétate de cellulose qui est conservé au réfrigérateur.

8 - Tertio butyl triacétate de cellulose

410 mg de bromotriacétate de cellulose et 850 mg de Ag_2CO_3 sont mélangés, puis mis en suspension dans 20 cm^3 de t-butanol anhydre. La suspension est portée à l'ébullition pendant 1 h 30.

On laisse refroidir et on ajoute 50 cm^3 de chloroforme pour solubiliser le triacétate. La solution est filtrée pour éliminer les sels d'argent, puis évaporée sous vide ; on obtient 330 mg de produit. Le produit est alors dissous dans le chloroforme (5 cm^3) puis précipité dans 50 cm^3 d'éthanol à 95 °/₀. Cette opération est recommencée deux fois. On obtient après séchage 260 mg de produit précipité et après évaporation des différentes solutions obtenues, 60 mg de produit en solution.

BIBLIOGRAPHIE

[1] R.U. LEMIEUX, R.K. KULINIG, H.J. BERNSTEIN, W.G. SCHNEIDER,
J. Amer. Chem. Soc., 1958, 80, 6098.

[2] R.U. LEMIEUX, J.D. STEVENS
Canad. J. Chem., 1965, 43, 2059.

[3] M.L. WOLFROM, R. HAQ
TAPPI, 1964, 47(4), 183.

[4] M.L. WOLFROM, S. HAQ
TAPPI, 1964, 47(11), 692.

[5] L. ODIER
Thèse, Grenoble, 1968.

[6] D. GAGNAIRE, L. ODIER, M. VINCENDON
J. Polymer Sci., 1969, Pt C 28, 27.

[7] F. BARNOUD, D. GAGNAIRE, L. ODIER, M. VINCENDON
Biopolymers, sous presse.

[8] S. VEIBEL, H. LILLELVND
Bull. Soc. Chim., 1938, 5, 494.

[9] B. LINDBERG
Act. Chem. Scand., 1949, 3, 151.

[10] D. HORTON, J.H. LAUTERBACK
J. Org. Chem., 1969, 34(1), 86.

[11] K. HEYNS, W.P. TRAUTWEIN, F. GARRIDO-ESPINOZA
Angew. Chem. Int. Ed., 1967, 6, 955.

[12] B. CASU, M. REGGIANI, C.G. GALLO, A. VICEVANI
Carbohyd. Res., 1950, 12, 157.

[13] T.E. TIMELL
J. Polymer. Sci., 1963, Pt C n° 2, 109.

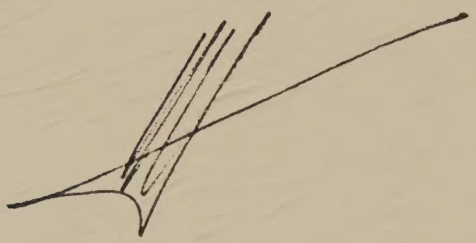
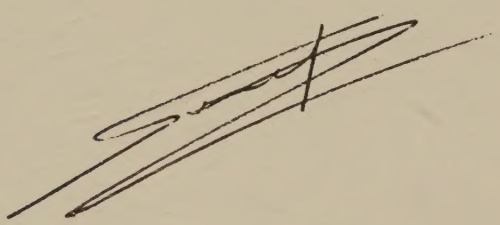
[14] PAART, O. SAMUELSON
Carbohyd. Res., 1970, 15, 111.

[15] L. BRISSAUD, G. FLEURY
Compt. Rend. Acad. Sci., 1946, 222, 1051.

Manuscrit reçu le 16 juin 1972

Vu et approuvé
Le Président de la thèse

Ph. TRAYNARD



Vu
et Permis d'Imprimer
Grenoble, le
Le Président de l'Université
Scientifique et Médicale